SITE PARIS-SUD
Centre d'Orsay
823

T H E S E

Présentée pour l'obtention
du grade de Docteur ès Sciences Naturelles
p a r
Françoise ESPARDELLIER *née* JOSET

SUJET

MODIFICATIONS DES RELATIONS ENTRE L'EPISOME SEXUEL
T LE CHROMOSOME DE CERTAINES SOUCHES Hfr de Escherichia C

Soutenue le : Juin 1971 devant la commission d'exam

Jury Proposé : Mr. BUTTIN, Président
Mr. VIGIER, Examinateur
Mr. MARCOVICH, Examinateur

UNIVERSITE PARIS-SUD

Centre d'Orsay

Série A, N° 823

T H E S E

Présentée pour l'obtention

du grade de Docteur ès Sciences Naturelles

p a r

Françoise ESPARDELLIER

SUJET

MODIFICATIONS DES RELATIONS ENTRE L'EPISOME SEXUEL ET LE CHROMOSOME DE CERTAINES SOUCHES Hfr de Escherichia Coli

Soutenue le : Juin 1971 devant la commission d'examen

Jury Proposé : Mr. BUTTIN, Président
Mr. VIGIER, Examinateur
Mr. MARCOVICH, Examinateur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je suis heureuse d'avoir ici l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de ce travail.

Cette étude a été effectuée dans le laboratoire du Dr Marcovich, qui m'a initiée à la microbiologie et au travail de recherche. Il m'a toujours fait confiance et laissé une grande autonomie dans le développement de mon travail. J'ai beaucoup apprécié la précision de son esprit critique, qui m'a incitée à être exigeante sur la rigueur du raisonnement et la construction des expériences.

Une partie de ce travail a été effectuée dans le laboratoire du Professeur T.H. Wood, à l'Université de Philadelphie, et a abouti à une agréable collaboration avec lui-même et deux jeunes chercheurs de son équipe, B. Low et R. Krisch.

La collaboration avec Ph. D. Harriman et J. Gots a été amicale, fructueuse et stimulante. Elle a beaucoup facilité la réalisation des expériences particulièrement délicates et techniquement très lourdes de localisation de l'origine de réplication de la souche B-11.

Le Professeur Buttin et le Dr. Vigier ont accepté d'assumer la présidence et la tâche de rapporteur à mon jury. Les discussions que j'ai eues avec eux et les conseils qu'ils m'ont donnés m'ont été utiles dans la rédaction finale du manuscrit et dans l'orientation ultérieure de mon travail. J'espère que cette occasion aura été le point de départ d'une collaboration et d'un échange de vues ultérieurs.

Je tiens à mentionner l'aide et le plaisir que m'ont apportés de nombreuses discussions avec Jacqueline George. J'ai particulièrement apprécié sa compétence, ses connaissances et son esprit d'analyse. Je souhaite que nos relations amicales continuent.

Le Professeur Schaeffer m'a constamment aidé en facilitant mes tâches d'enseignement et en me montrant une confiance que j'espère mériter.

Je dois beaucoup à Raymonde Fournier, qui a fait preuve d'une grande capacité technique, d'une compréhension et d'un esprit d'initiatives dans un sujet assez complexe. Elle a dû bien souvent mettre au point les techniques et effectuer les expériences seule, ce qu'elle a fait avec une remarquable compétence. Cette collaboration s'est doublée d'une amitié tout aussi appréciable.

Les membres, passés et présents, du groupe de Mr. Marcovich m'ont constamment apporté leur aide et leur soutien par des discussions amicales.

La compétence, le dévouement et l'amitié de Mme Hamdous ont contribué à me faciliter un grand nombre de tâches administratives et à résoudre de nombreux problèmes courants.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543511_0017

CHAPITRE A

INTRODUCTION

Un grand nombre de travaux effectués au cours des quinze dernières années ont abouti à la mise en place d'un schéma du mécanisme de conjugaison chez E. Coli K 12. L'aspect physique, ou mécanique, et l'aspect moléculaire, ont été envisagés (Jacob, Wollman 1961 ; Jacob Brenner et Cuzin 1963). Les caractéristiques principales de ce mode de reproduction parasexuée semblaient ainsi définies.

Or il s'avère qu'un certain nombre d'observations, récentes ou non, sont en opposition avec les schémas admis. D'autres modèles ont été suggérés qui remettent en question les principales fonctions attribuées au facteur sexuel au cours de la conjugaison :

a) le transfert du chromosome a été expliqué par l'intégration de F, ce qui aboutit à la formation d'une structure continue similaire à celle de F seul (Jacob et Wollman 1961). Mais chez certaines souches F^+ les cellules responsables d'une proportion importante du transfert chromosomique ne seraient pas des mutants Hfr stables présents spontanément dans la population, mais bien les cellules F^+ elles-mêmes. Le transfert du matériel chromosomique serait effectué par l'intermédiaire d'une forme Hfr instable (Lerderberg 1958, Reevues 1960, Curtiss 1962), ou même indépendamment de celui du facteur sexuel (Curtiss et Renshaw 1969a et b).

b) Jacob et Wollman (1961) avaient proposé que le chromosome mâle était poussé par le facteur sexuel à partir du Hfr. Des travaux de Curtiss et Chamarella (1966) suggèrent au contraire qu'un rôle actif est joué par la cellule

réceptrice. Aucune de ces deux hypothèses n'est en contradiction avec le modèle d'une réplication spécifique du transfert dirigée par F (Jacob et all. 1963). Cependant un certain nombre de résultats récents (Rupp et Ihler , 1968 ; Ohki et Tomizawa, 1968) indiquent que l'ADN du mâle est transféré sous forme simple chaîne. Ceci implique qu'aucune réplication spécifique n'a eu lieu dans le mâle avant le transfert, et remet en question le rôle du système de réplication du F pendant la conjugaison. En fait un grand nombre de résultats contradictoires ont été publiés à propos de la nécessité d'une synthèse d'ADN concomittante du transfert (Cuzin et all. 1967).

c) Bien que l'on n'ait jamais mis en évidence de fonctions de recombinaison ou d'intégration chez l'épisome F, il ne semble pas exclu qu'il puisse s'intégrer dans le chromosome en l'absence des systèmes de recombinaison du chromosome (Clowes Moody 1966).

Plusieurs auteurs ont utilisé les radiations comme moyen devant permettre d'expliquer certains aspects de la conjugaison. Ce moyen a en effet permis de montrer que l'insertion de F dans le chromosome est un phénomène de même nature que la recombinaison entre deux matériels génétiques homologues (Hayes 1953). L'étude de l'effet des rayonnements UV (Jacob et Wollman 1955) ou ionisants (Marcovich 1961, Wood et Marcovich 1964) et des désintégrations de radiophosphore incorporé dans l'ADN du mâle (Fuerst, Jacob et Wollman 1956 ; Krisch 1965) a confirmé les hypothèses proposées pour expliquer le transfert et l'intégration du matériel du mâle dans la femelle.

La plus grande partie des études consacrées à l'effet des radiations sur la conjugaison ont été effectuées sur la même souche mâle, Hfr H. L'application de ces techniques à d'autres mâles Hfr nous a conduits à mettre en évidence la

possibilité d'une modification, induite par les radiations, des relations entre F et le chromosome bactérien (Joset, Low et Krisch 1964). Ces mâles sont induits, avec une très haute fréquence, à transférer leur chromosome selon une nouvelle séquence, caractéristique de chaque souche. Une étude systématique a montré que cette situation est courante, puisqu'elle a été observée dans environ la moitié des souches étudiées (Espardellier-Joset et Fournier 1966). Ce phénomène ne peut s'expliquer que par une modification de l'attachement de F, ou du processus de la réplication de transfert. D'après cette deuxième possibilité, qui est plus probable, le contrôle du transfert échapperait en partie à F, ou au moins son intervention dans le déclenchement du transfert serait indirecte.

Les implications de ces deux hypothèses vont être envisagées par rapprochement avec d'autres situations connues.

1.- La première possibilité consisterait en une transposition du facteur sexuel en un autre site du chromosome.

Les remaniements de régions chromosomiques chez E. Coli et les espèces voisines, et d'une façon générale chez les procaryotes et les virus, sont des événements rares, probablement perce qu'ils sont la plupart du temps létaux. Quelques cas seulement en ont été décrits . Ames et coll. (1963) et Lévinthal et Nikaïdo (1969) ont trouvé des souches de Salmonella typh. possédant un remaniement des régions His et Rough B. Quelques souches obtenues chez E. Coli (Jacob et Wollman 1961 ; Dewitt et Adelberg 1962 ; Matsushiro et all. 1962 ; Jacob et all. 1964), dont les transpositions concernent diverses régions du chromosome (His, Trp, Lac) semblent avoir gardé leur génome intact. D'autres ont été préparées par des techniques permettant de repérer des modifications métaboliques dues à ces transpositions (Cuzin Jacob 1964 ; Scaife et Pekhov 1964 ; Jacob et all. 1965 ; Scaife 1966 ; Signer et Beckwith 1966a, b, c).

- Le déplacement d'un épisome intégré peut constituer une transposition pour la cellule hôte. En général il n'entraîne pas de modifications physiologiques : l'épisome entraîne rarement avec lui un segment de chromosome. Il est lui-même rarement inactivé au cours de ce processus (Willetts et Broda 1969). Il est en fait possible que les mécanismes responsables de ces phénomènes ne soient pas les mêmes que ceux qui conduisent au déplacement ou à l'intégration d'une région du chromosome (système rec, Clark et Margulies 1965 ; Howard-Flanders 1968).

- Quand un épisome intégré redevient autonome, cela ne correspond pas à une délétion proprement dite puisque l'épisome ne porte pas de gènes indispensables à la cellule, sauf dans le cas de la formation de particules transductrices ou de F' (Broda et all. 1964). Cette dernière situation correspond presque à une translocation, c'est-à-dire au déplacement d'un segment chromosomique sur un autre chromosome. Le déplacement de l'épisome sexuel suivant l'un quelconque de ces processus est facile à mettre en évidence par ses conséquences : le type de conjugaison de la cellule mâle se trouve changé. Ces phénomènes, tels qu'ils ont été décrits dans la littérature, sont assez rares. Même quand ils sont produits par un agent inducteur, il n'est pas possible de prévoir exactement quelle va être la modification induite, contrairement à ce qui se passe par exemple par irradiation d'une population de bactéries lysogènes. De ce point de vue, le phénomène qui va être présenté ici d'induction d'une modification de la séquence de transfert chez certains Hfr, se rapproche davantage de l'induction d'un prophage, par son efficacité et sa spécificité.

2.- La deuxième possibilité envisagée pour expliquer la modification de la séquence d'injection se situe au niveau de la régulation de la réplication contrôlée par F. Une cellule mâle de E. Coli contient deux réplicons, dont les fonctionnements ne sont pas indépendants. Jacob, Brenner et Cuzin (1963) ont proposé un type de régulation entre ces deux systèmes. Le comportement de certains Hfr à réplication thermosensible (Caro 1971) apporte la preuve d'un autre type de relation pouvant exister entre ses deux réplicons. Des cellules portant une déficience conditionnelle de la synthèse du DNA survivent, dans des conditions non permissives, grâce à l'intégration d'un facteur sexuel dans leur chromosome.

Le phénomène mis en évidence dans ce travail reflète peut-être un autre aspect du fonctionnement du système de réplication du facteur sexuel. La réplication de transfert, telle qu'elle est définie dans le modèle de Jacob et all. (1963), pourrait être modifiée par l'irradiation, de telle sorte que F perdrait tout ou partie du contrôle de cette réplication.

Le travail présenté débute par une étude détaillée de l'effet des radiations sur différentes étapes de la conjugaison, chez le mâle Hfr H. La séquence de transfert de cette souche est stable vis à vis des radiations. Cette étude sert de référence à la suite du travail.

Deux cas de modifications de la séquence d'injection du chromosome sont ensuite étudiés, parce qu'ils représentent deux types de modifications différents : dans le cas des mâles du groupe Ra, la séquence de transfert induite, caractéristique du groupe, est apparemment indépendante de la séquence normale de chacun des mâles du groupe. Chez le mâle B-11, représentatif du deuxième groupe, les radiations produisent une inversion véritable de la séquence de transfert.

L'étude génétique effectuée sur chacun de ces mâles nous a conduits à la conclusion que la modification induite ne peut s'expliquer par l'acquisition d'un nouveau caractère stable, tel que attachement du F en un autre site du chromosome. Une étude des relations éventuelles entre la modification induite et les processus de réplication de l'ADN a alors été entreprise.

L'exposé du travail expérimental est précédé par une étude des connaissances actuelles concernant les principales fonctions du facteur sexuel. Cette analyse bibliographique est envisagée dans le cadre du phénomène étudié dans ce travail. En particulier le mode d'intégration de F dans le chromosome et les relations entre cette intégration et la capacité de transférer le chromosome constituent un aspect important de cette analyse.

Pour plus de facilité de lecture, et parce que les techniques utilisées dans ce travail sont classiques, les processus expérimentaux ne seront donnés que dans la légende des figures. Les souches, et les milieux utilisés sont décrits dans l'appendice.

ooo ooo

ooo

C H A P I T R E B

LES FONCTIONS DU FACTEUR SEXUEL

Le facteur sexuel de E. Coli K 12 est un épisome de poids moléculaire 4,5. 10^6 daltons, de longueur environ les 2/100 de celle du chromosome (Freifelder 1968). Cette dimension indique qu'il doit comprendre au maximum une centaine de gènes (Willetts et Broda 1969). On lui reconnaît actuellement trois groupes de fonctions principaux. Il s'agit des fonctions de réplication, de transfert et d'incompatibilité. Le facteur sexuel ne porte pas de gènes indispensables à la cellule, sauf dans le cas des F' formés par délétion d'une région du chromosome (Scaife et Pehkov 1964).

I - FONCTIONS DE REPLICATION

Jacob, Brenner et Cuzin (1963), ont proposé que le facteur F forme un réplicon autonome à l'état non intégré, et devienne soumis au système réplicatif du chromosome chez les Hfr. De nombreux mutants conditionnels de F ont été isolés (Jacob, Brenner et Cuzin 1963, Cuzin et Jacob 1967) dont le comportement correspond à celui que l'on pouvait attendre d'après le modèle de régulation proposé. L'épisome de ces cellules ne se maintient dans les conditions non permissives qu'à l'état intégré.

Il n'est actuellement pas possible de savoir à quel niveau ces mutations bloquent la réplication à haute température. Une étude préliminaire des possibilités de complémentation entre différents mutants ADN_{ts} de F a conduit à définir 3 cistrons impliqués dans la réplication de cet épisome (Cuzin 1966, Cuzin et Jacob 1965).

La réplication du F est aussi soumise à un contrôle par le chromosome ou par F lui-même, qui maintient le rapport nombre de F/nombre de chromosomes par cellule à peu près égal à 1 (Jacob et Monod 1961, Revel 1965).

Les résultats précédents sont en accord avec l'existence d'un système de réplication propre du F, indépendant de celui du chromosome. Par contre Jacob et coll. (1963) et Cuzin et Jacob (1967) ont isolé un mutant chromosomique chez lequel la réplication du F seul est bloquée. De même Bastarrachea et Willetts (1968) ont trouvé un mutant chromosomique qui modifie la sensibilité à l'acridine orange de la réplication du F. Les fonctions modifiées dans ces mutants sont inconnues.

II - FONCTIONS DE TRANSFERT

Le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin (1963) implique que la réplication du F et le transfert ne sont que deux aspects d'une même fonction. Les premiers mutants isolés sur l'un ou l'autre de ces deux critères s'avèrent modifiés pour les deux fonctions à la fois. Mais Cuzin et Jacob (1967) ont isolé des mutants de F chez lesquels ces deux fonctions sont modifiées indépendamment. Des études de complémentation utilisant diverses techniques ont permis de définir dix cistrons impliqués dans le transfert (Clark et all. 1970). L'étude des fonctions modifiées chez les souches portant ces F mutants montre que la fonction de transfert recouvre en fait un nombre assez important d'étapes :

a) La présence d'antigènes de surface spécifique du mâle, (Orskov et Orskov 1960, Sneath et Lederberg 1961) a été assimilée à l'existence des "pili" (Brinton et coll. 1964) responsables de l'appariement des cellules parentales (Curtiss et coll. 1968).

b) L'expression de la capacité à transférer du matériel génétique du mâle à la femelle, que le facteur sexuel soit autonome ou intégré dans le chromosome est très mal définie. Elle suppose, après l'accouplement des cellules, la formation du pont de conjugaison, et au moins le déclenchement du transfert. Cette dernière étape, appelée "mobilisation" inclut (De Haan et Gross 1962 ; Scaife et Gross 1963) tout ce qui est nécessaire pour mettre le chromosome dans l'état requis pour le transfert (initiation éventuelle d'une réplication dite de transfert, ouverture spécifique de la forme végétative circulaire).

c) Le transfert lui-même n'est peut-être pas contrôlé uniquement par le facteur sexuel. Il a été proposé que la femelle y joue un rôle actif, soit par appariement immédiat du chromosome mâle (Curtiss et Chamarella 1966), soit au niveau de la réplication de l'ADN transféré (Bonhoeffer et all. 1967 ; Cohen et all. 1968).

Un grand nombre de travaux ont été consacrés au rôle de F pendant le transfert : il s'agit de savoir si il existe une réplication spécifique du transfert, régulée par le facteur sexuel, comme l'ont proposé Jacob, Brenner et Cuzin (1963). Cet aspect des fonctions du F sera discuté plus loin (Chapitre F, section II).

d) La possibilité pour F de s'intégrer dans le génôme bactérien est considérée en général comme une condition nécessaire au transfert des gènes chromosomiques (Jacob et Wollman 1961). Cette intégration semble effectuée par des enzymes codés par le chromosome. Aucun système de recombinaison codé par F, ni du type "rec", ni du type "int" de λ, n'a été mis en évidence jusqu'à présent.

III - INCOMPATIBILITE ET IMMUNITE

L'étude de cet aspect du fonctionnement de F est intéressante parce qu'il s'agit en fait d'un aspect du système de réplication ou du système de transfert. Ce phénomène consiste en une exclusion par un F déjà présent dans la cellule, intégré ou non, de tout autre facteur sexuel ou épisome apparenté. Malgré le blocage des fonctions de réplication de F à l'état intégré, les fonctions d'exclusion s'expriment quand même, ainsi que certaines au moins des fonctions de transfert (formation des pili).

De nombreux auteurs se sont attachés à préparer des mâles portant plusieurs facteurs sexuels. Les doubles mâles isolés sont très instables, et ségrègent les mâles simples des deux types. Ceci a été observé systématiquement dans le cas de la présence simultanée de 2 F non intégrés (Hirota et Sneath 1961 , Scaife et Gross 1962), et d'un F ou d'un F' surinfectant une cellule Hfr (Mass 1963).

La coexistence de plusieurs F intégrés dans le chromosome est aussi précaire. Clark a pu préparer un double (196[illegible] capable d'injecter son chromosome à partir de deux origines différentes. Il est probable que dans ce cas, à l'état végétatif, l'immunité ne se fait plus sentir parce que ces deux facteurs sexuels sont réprimés pour leur réplication, par le système du chromosome. Au moment de la conjugaison chaque cellule transfère son matériel seulement suivant l'une des séquences possibles. Il est possible d'imaginer une compétition entre les deux F, à la suite de l'appariement avec la cellule F^-. Le premier épisome "induit" inhiberait le fonctionnement ou la réplication du deuxième.

Un cas de perte de pouvoir d'exclusion a été observé par Maas et Goldschmidt (cité par Willetts et Broda 1969) ; ces auteurs ont isolé une souche stable Hfr/F'lac. La mutation a eu lieu dans l'épisome intégré, car après élimination du F'lac par l'acridine orange, le Hfr devient déficient pour la fonction de transfert, et acquiert des propriétés de réceptrice. Dans ce cas, la fonction d'exclusion semble liée aux propriétés de transfert, à moins que celui-ci ne soit bloqué secondairement par une déficience du système de réplication.

IV - NATURE ET MECANISME DE L'ATTACHEMENT DU FACTEUR SEXUEL AU CHROMOSOME.

Le modèle proposé par Campbell (1962) pour λ fait intervenir un acte de recombinaison par crossing-over entre les formes circulaires de l'épisome et du chromosome. Ce modèle est aussi applicable dans le cas du facteur sexuel. Des preuves indirectes de l'insertion du F dans le chromosome ont été obtenues et sont en accord avec la proposition de Campbell : l'insertion d'un F entre deux gènes conduit à une diminution de la liaison génétique des deux marqueurs adjacents (Pittard 1965). On connait aussi un certain nombre de souches chez lesquelles l'insertion de F a induit une mutation, probablement par intégration de l'épisome à l'intérieur du gène (Richter 1961 ; Curtiss 1964 ; Schwartz 1966).

L'existence des mâles F' confirme ce mécanisme d'intégration de F : en effet l'épisome F' entraîne un segment du chromosome qui peut comporter des gènes situés d'un même côté ou de part et d'autre du F dans la souche Hfr d'origine. On observe dans le chromosome une délétion qui correspond au segment emporté par F (Scaife et Pekhov 1964 ; Broda et all. 1964).

La fréquence de passage des formes F^+ ou F' à Hfr correspond à ce que permet de prédire un mécanisme de type recombinatoire, faisant intervenir une homologie entre les ADN impliqués. Il se forme environ un Hfr pour 10^4 cellules F^+ (Jacob et Wollman 1961) ou F' haploïdes (Pittard et Ramakrishan 1964). Par contre chez une F' diploïde, la fréquence est beaucoup plus élevée (Pittard et Adelberg 1964). Alors que l'épisome d'un F' haploïde, comme celui d'un F^+, peut se fixer en des points nombreux du chromosome (Matney et all. 1963), le F' d'un mâle diploïde partial s'intégrera à peu près toujours de façon contiguë à la région diploïde (Scaife et Gross 1963 ; Pittard et Adelberg 1964).

Il est généralement admis que l'intégration du facteur sexuel est réalisée par des enzymes des fonctions de recombinaison de la bactérie. En effet des souches F^+ ou F' portant des mutations du système "rec" forment des Hfr stables avec une fréquence très faible. Des traitements tels que l'irradiation par les UV, qui sont connus pour leur propriété d'augmenter les fréquences de recombinaison, augmentent effectivement la fréquence d'apparition de Hfr dans une population F^+ (Hayes 1953).

V - EXISTENCE D'AUTRES PROCESSUS DE TRANSFERT CHROMOSOMIQUE

Cependant il semble que d'autres modes de formation de Hfr, ou d'autres processus conduisant à un transfert des déterminants génétiques du mâle à la femelle, peuvent exister.

1) Clowes et Moody (1966) ont isolé quelques Hfr stables à partir de souches F^+recA, avec une fréquence qui ne semble pas compatible avec l'activité résiduelle de la fonction recA. L'étude de ces Hfr montre que le transfert n'est pas orienté, suggérant soit un mécanisme de transfert sans intégration réelle de F, soit un transfert de segments de chromosome cassés. Des cas de recombinaison anormale ont été décrits : les efficacités de transduction par des phages hybrides 80-λ et de

formation de délétions dans la région Trp-Ton_B sont les mêmes dans des souches rec^- et rec^+ . L'auteur suggère qu'un mécanisme de recombinaison ne nécessitant pas d'homologie entre les deux ADN impliqués, pourrait être en cause. Il pourrait s'agir d'un phénomène non enzymatique, vu la rareté de ces événements (Franklin 1967). Inselburg (1967) arrive aux mêmes conclusions par l'étude de délétions apparaissant dans les gènes Col V et Col B de souches isogènes rec^- et rec^+.

2) Un système de recombinaison particulier existe chez les phages tempérés : la fonction d'intégration du phage (Signer et Beckwith 1966) est utilisée exclusivement, que le système rec de la cellule hôte fonctionne ou non. Ce système implique une recombinaison entre des régions homologues (Signer et Weil 1968 ; Gingery et Echols 1968). Le même processus pourrait exister pour le facteur sexuel, et s'exprimerait par l'attachement de F à un nombre restreint de sites chromosiques, définis par une séquence de bases particulières (Willetts et Broda 1969).

3) L'hypothèse d'un attachement non covalent du F au chromosome a été avancée à la suite de l'observation, faite par plusieurs auteurs, que la fréquence de transfert de gènes chromosomiques de certaines souches F^+ ne peut être expliquée par la seule fertilité des Hfr stables présents dans la population (Lederberg 1958 ; Reeves 1960 ; Hayes 1960; Curtiss et all. 1969 ; Broda 1967).

Une étude plus poussée de Curtiss et coll. a amené ces auteurs à modifier l'hypothèse initiale d'appariement non covalent. Curtiss a isolé deux types de souches F^+ : les unes (classe I) donnent lieu à la formation de Hfr avec une fréquence d'environ 10^{-4} Hfr/cellule. Chez les autres (classe II) aucun Hfr stable n'apparaît (Curtiss et Stallions 1969). Cependant le comportement de ces deux classes est identique pour

toutes les autres propriétés liées au système de recombinaison (Curtiss et Renshaw 1969b). Une seule différence est apparue : la capacité de guérison par l'acridine orange, qui est à peu près totale pour les souches de la classe I, est très réduite dans le cas de la classe II, ceci malgré une sensibilité accrue des cellules à ce colorant (Curtiss et Renshaw 1969a). Curtiss a calculé que dans ces conditions, le pourcentage de recombinants chromosomaux attribuables aux Hfr stables décelés dans une population de F^+ de la classe I est de 15% (Curtiss et Stallions 1969). Ainsi d'après lui, même dans des souches normales, il doit exister deux processus permettant le transfert du chromosome : le processus "normal" dû à l'intégration de F ; l'autre moyen suggéré par Curtiss consisterait en un transfert indépendant de F et du chromosome, soit en parallèle par 2 ponts de conjugaison distincts, soit successivement, le premier élément à passer n'étant pas défini. Pour Curtiss, l'absence apparente d'intégration de F serait la conséquence d'une modification structurale de F, qui resterait linéaire mais cependant capable de se répliquer. Son intégration dans le chromosome ferait aussi de ce dernier une structure linéaire, qui serait létale (Curtiss et Renshaw 1969 a et b).

En résumé, il semble que les cas de transfert non "classique" sont connus depuis longtemps et qu'ils sont assez fréquents. Aucune des hypothèses proposées jusqu'à présent ne semble acceptable, au moins sans un certain nombre de modifications.

ooo ooo

ooo

C H A P I T R E C

MECANISME DE LA TRANSMISSION DU MATERIEL GENETIQUE AU COURS DE LA CONJUGAISON CHEZ LE MALE Hfr H UTILISATION DES RADIATIONS

Le mécanisme de la transmission du matériel génétique au cours d'un croisement entre un mâle Hfr et une femelle F⁻ a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux.

Le mâle Hfr H, l'un des premiers isolés (Hayes 1953) a servi de modèle, de souche de référence, à la plupart des travaux qui ont permis d'élucider le mécanisme de la conjugaison (Jacob et Wollman 1961 ; Hayes 1953).

Le modèle ainsi élaboré s'est trouvé confirmé chez la plupart des autres souches. Il n'est cependant pas exclu que Hfr H et les souches à comportement similaires correspondent à un type de conjugaison particulier.

Nous allons, dans ce chapitre, revoir rapidement certains aspects physiques du transfert et de l'intégration du matériel mâle dans le zygote, tels qu'ils ont été mis en évidence par diverses techniques. En particulier, les effets de divers types de radiations seront décrits. Ce moyen d'investigation a été utilisé assez largement sur la souche Hfr H, et a abouti à confirmer, d'une façon générale, les mécanismes proposés antérieurement. Nous verrons dans la suite de ce travail qu'un nombre important de souches Hfr ne répondent pas à l'irradiation de la même façon. L'étude comparative de ces deux types de souches sera un des éléments utilisé pour expliquer l'effet des radiations sur les mâles à comportement "anormal".

I - LES CARACTERISTIQUES DU TRANSFERT

Selon la proposition de Jacob et Wollman (1961), nous emploierons le mot "transmission" pour couvrir l'ensemble des phénomènes conduisant à la formation d'un recombinant, alors que le terme "transfert" désigne spécifiquement le passage du chromosome du mâle dans la cellule femelle.

Le transfert du chromosome d'un Hfr à une cellule réceptrice est orienté et, en général partiel, la séquence d'entrée des marqueurs étant caractéristique de chaque souche. L'origine et la direction de transfert sont déterminées par la position et l'orientation du facteur sexuel dans le chromosome (Scaife et Gross 1963). Le F lui-même possède une polarité de transfert (Jacob et Wollman 1961) qui explique la polarité qu'il introduit dans le chromosome. L'efficacité de transmission des marqueurs est inversement proportionnelle à leur distance à l'origine d'injection. Ceci traduit probablement la fréquence de rupture du chromosome. Le gradient de transfert défini comme la variation de la fréquence de transmission en fonction de la distance à l'origine, a une pente indépendante du mâle étudié (Fig. C1).

L'analyse du gradient et l'étude de la cinétique des marqueurs permettent de localiser de façon assez précise le site d'attachement du F dans le chromosome.

Il faut tenir compte du fait que les temps d'entrée mesurés au cours d'une expérience de cinétique comprennent le temps nécessaire aux étapes préliminaires au transfert. De Haan et Gross (1962) ont pu mesurer la durée moyenne de cette mise en place du transfert, qui est de l'ordre de 3 à 8 minutes.

II - UTILISATION DES RADIATIONS POUR L'ANALYSE DES MECANISMES DE TRANSFERT

1) Mécanisme d'action des radiations

Les ionisations produites par les rayons X et γ et par les particules α aboutissent, au niveau de l'ADN, à des cassures de l'une ou des deux chaînes de la double hélice, suivant la densité d'ionisation des radiations utilisées (Freifelder 1968). Les désintégrations du Phosphore 32 incorporé dans l'ADN conduisent au même effet, bien que par un processus différent (Hershey et all. 1951 ; Ogawa et Tomizawa 1967a et b).

Les effets de la lumière ultraviolette (UV) dépendent de la longueur d'onde utilisée, et sont spécifiques. A 2537 Å, longueur d'onde utilisée dans les expériences décrites ici, ce rayonnement est absorbé spécifiquement par les acides nucléiques, en particulier par les bases pyrimidiques. Il se forme plusieurs types de lésions caractéristiques, dont l'un des plus fréquents et probablement des plus efficaces pour causer la mort des cellules (Setlow, Setlow 1962 ; Sauerbier, Haug 1964), est la dimérisation de deux bases pyrimidiques adjacentes dans les chaînes d'ADN (Beuker, Berends 1960).

L'irradiation d'une bactérie perturbe la synthèse de l'ADN, quel que soit le type de radiations utilisé. Il apparaît en particulier des phénomènes de réparation, de sorte que la synthèse de l'ADN ne continue pas uniquement au point où elle en était au moment de l'irradiation, c'est-à-dire à la fourche de réplication (Billen, Hewitt, Jorgensen 1965).

L'irradiation ultraviolette introduit en outre un arrêt momentané de la synthèse de l'ADN (Kelner 1953).

Il semblait donc intéressant de comparer les effets de ces divers types de radiations sur les différentes étapes de la conjugaison.

2) Les premières études concernant l'action des radiations sur le système de conjugaison de E. Coli K 12 ont été effectuées sur la souche Hfr H, par irradiation ultraviolette (Jacob, Wollman 1955) et par désintégration de radiophosphore incorporé dans l'ADN (Fuerst, Jacob, Wollman 1956). Ces auteurs ont étudié le segment chromosomique O - Gal, qui représente environ 1/4 du chromosome. Ils ont donné des doses assez faibles, correspondant à une survie minimum des mâles de l'ordre de 10^{-2} . Ils ont abouti aux conclusions suivantes :

Les désintégrations de 32P ou l'irradiation UV chez le mâle avant le croisement, conduisent à une diminution de la transmission des marqueurs selon une fonction exponentielle de la dose. L'irradiation de la transmission des marqueurs après irradiation UV est indépendante de leur position sur le chromosome, alors que l'inactivation par le 32P augmente avec leur distance à l'origine de transfert.

Ces expériences sont assez limitées. Les renseignements qu'elles pouvaient apporter sur les mécanismes de la conjugaison méritaient qu'elles soient reprises et élargies. Marcovich (1961) a utilisé les rayons X comme source de radiations, Wood et Marcovich (1964) les particules α émises par du ^{232}Po, puis Krisch (1965) le 32P incorporé. Les résultats de ces auteurs vont être brièvement rappelés.

3) Action des radiations ionisantes sur le mâle avant conjugaison.

Quand le mâle Hfr H est irradié soit par des rayons X soit par des particules α immédiatement avant le croisement avec une F^- , la transmission de chacun des marqueurs diminue exponentiellement en fonction de la dose. L'inactivation de transfert d'un marqueur est proportionnel à sa distance à l'origine d'injection. L'étude de la constitution génétique

des recombinants formés dans ces conditions et de l'effet de l'irradiation de la femelle, conduit à considérer que ces radiations produisent des lésions de transfert distinctes des lésions létales. Ces lésions de transfert sont réparties au hasard sur le chromosome, et empêchent le transfert de la portion chromosomique qui leur est distale par rapport à l'origine. Aucune inhibition de la capacité des cellules à conjuguer, c'est-à-dire à mettre en place les mécanismes préalables au transfert, et aucune perturbation des processus d'intégration n'ont été observées (Marcovich 1961 ; Wood, Marcovich 1964).

Nous avons confirmé ces résultats pour l'ensemble du chromosome en étudiant les perturbations de la transmission de marqueurs répartis sur tout le chromosome, y compris un marqueur distal, Arg_B , transféré à 85 min environ (Fig. C2 ; les plateaux qui apparaissent aux plus fortes doses ne sont pas reproductibles, et n'ont probablement aucune signification dans les processus qui nous intéressent).

L'étude de l'effet des désintégrations du 32P incorporé dans l'ADN de Hfr H sur la conjugaison a été reprise par une étude détaillée de Krisch (1965) et par des expériences personnelles. Les résultats observés par Fuerst et coll.(1956) sur une courte région du chromosome se sont trouvés confirmés pour au moins la moitié de celui-ci, et très probablement pour la totalité, et pour des doses beaucoup plus importantes, allant jusqu'à une survie des mâles de 10^{-5} .

De même que les radiations ionisantes, le 32P ne produit aucune lésion inhibant la capacité des mâles à conjuguer.

L'efficacité d'inactivation du transfert, définie comme la probabilité d'empêcher le transfert d'un marqueur situé à l'extrémité terminale du chromosome, est du même ordre de grandeur que l'efficacité létale, respective de chaque type de radiations. Pour une lésion létale, trois lésions de transfert sont produites par génôme. Si l'on admet que ces lésions

sont du même type, cela veut dire qu'une lésion de transfert a une probabilité de 1/3 de tuer la cellule (Marcovich 1961).

4) La conclusion proposée par ces auteurs que les lésions produites agissent au niveau du transfert est basée sur le raisonnement suivant : ces lésions agissent à un niveau où la position des marqueurs est importante. Ce ne peut être qu'à une étape située au moment ou après le transfert proprement dit. La seule étape postérieure au transfert pour laquelle une polarité, donc éventuellement un gradient, pourrait exister, est celle de l'intégration, par exemple par le biais d'un appariement préalable orienté des deux génomes, comme cela a été proposé par Curtiss et Chamarella (1966). D'après Jacob et Wollman (1958) il n'existe pas de gradient, donc probablement pas de polarité obligatoire, au niveau de l'intégration. Dans ces conditions, la conclusion que les radio-lésions agissent au niveau du transfert s'impose, puisque le transfert serait alors la seule étape comportant une polarité obligatoire. Sinon, rien ne permet dans les expériences décrites ci-dessus, de différencier une action au niveau du transfert d'une action au niveau de l'intégration.

Cette différence n'est pas fondamentale ici en ce qui concerne le mécanisme moléculaire d'inhibition de la transmission au niveau de l'ADN. Les lésions dues aux radiations ionisantes conduisant à des cassures de l'une ou des deux chaînes d'ADN, deux possibilités se présentent : une action directe, par séparation physique des deux segments formés peut expliquer aussi bien un blocage du transfert que la formation d'un crossing-over dans le zygote, suivant les deux hypothèses indiquées ci-dessus. Un arrêt de la réplication de l'ADN au niveau de la cassure résulterait en un arrêt du transfert, selon l'hypothèse proposée par Jacob et all. (1963).

Nous verrons plus loin que l'interprétation de l'effet des lésions UV sur la synthèse de l'ADN, ou des mécanismes de réparation de ces lésions, peut être très différente suivant que les lésions bloquent le transfert ou passent dans la femelle.

III - EFFET DE LA LUMIERE ULTRAVIOLETTE SUR LE TRANSFERT

Jacob et Wollman (1955) avaient trouvé dans le cas de l'irradiation du mâle par la lumière ultraviolette des résultats différents de ceux obtenus avec les radiations ionisantes ou le 32P. On pouvait se demander si ces différences reflétaient un effet propre du type de rayonnement utilisé, explicable par son mode d'action très différencié, ou correspondaient à un artefact dû aux conditions expérimentales. C'est pourquoi nous avons repris ce problème de façon détaillée (Joset, Wood 1966).

Les résultats obtenus après irradiation et croisement d'une culture de mâles Hfr H sont donnés dans les figures C3 et C4. Dans la figure C3-A, la fréquence de transmission des marqueurs du mâle est représentée en fonction de la dose d'UV, c'est-à-dire pour chaque dose, le rapport du nombre de recombinants de chaque type au nombre initial de mâles. La courbe de survie des mâles est aussi indiquée. Dans la figure C3-B, ces résultats sont portés en "survie", c'est-à-dire rapport des nombres de recombinants de chaque type à une dose donnée et sans irradiation.

Trois remarques peuvent être faites à partir de ces figures :

1) L'inactivation suit une loi exponentielle en fonction de la dose ;

2) Le niveau de l'intersection des courbes avec l'axe des ordonnées (dose 0) (Fig. C3-A) diminue avec la distance du marqueur à l'origine de transfert. Les valeurs obtenues représentent la fréquence de transmission de chaque marqueur sans irradiation, soit le gradient normal de transfert. Ce dernier est représenté de façon plus parlante dans la figure C4, courbe témoin.;

3) Les pentes des courbes (Fig. C3) augmentent avec la distance des marqueurs à l'origine. Ceci est en désaccord avec les résultats de Jacob et Wollman (1955). Cependant ces pentes (Fig. C3-B) ne sont pas proportionnelles aux longueurs de chromosome comprises entre l'origine et le marqueur considéré, comme cela est le cas avec les radiations ionisantes (Marcovich 1961 ; Wood et Marcovich 1964).

La figure C4-A montre la variation du gradient de transfert, c'est-à-dire du rapport du nombre de recombinants au nombre initial de mâles en fonction de la position des marqueurs sur le chromosome, pour chaque dose. Cette représentation permet de séparer deux composantes de l'augmentation des pentes observées dans la figure C3-B. D'une part la linéarité* des courbes traduit l'augmentation exponentielle de l'inactivation de la transmission avec la longueur considérée. Ceci est compatible avec une répartition au hasard des lésions sur le chromosome. Ce résultat est similaire à ceux observés après irradiation X ou α. L'extrapolation à la distance 0, c'est-à-dire à l'origine de transfert, des courbes donne des valeurs qui diminuent avec la dose. Un graphique similaire réalisé après irradiation X ou α du mâle ne montre pas cette propriété (Wood et Marcovich 1964, voir Fig. C4-C) : dans ce cas, les

---

* La distorsion des courbes dans la région Gal-Trp tient à la nature du caractère de fermentation Gal$^+$. Il est difficile d'avoir de bonnes conditions de sélection pour ce marqueur. Dans l'expérience décrite , les valeurs obtenues sont systématiquement trop faibles.

extrapolations coupent l'axe des ordonnées en un même point. Ces intersections, qui représentent la fréquence de transmission d'un marqueur supposé situé à une distance nulle de l'origine, sont en fait proportionnelles à la capacité des mâles à croiser. La différence observée entre les effets des X et des UV dans la figure C3-B n'est donc pas due à une différence dans le mode d'inactivation du transfert. Les UV perturbent en outre une autre étape de la conjugaison, pour laquelle la séquentialité de transfert ne joue pas. On peut définir cet effet comme une inactivation de la capacité des mâles à conjuguer.

A partir de la figure C4-A, on peut à chaque dose calculer la probabilité d'inactivation de cette aptitude à conjuguer. La courbe qui en résulte montre une diminution exponentielle en fonction de la dose (Fig.C3-A, courbe "extrapolate survival"). Si les courbes d'inactivation de la transmission obtenues dans la figure C3-B sont corrigées de façon à éliminer cet effet des UV sur l'aptitude à conjuguer, on obtient les courbes de la figure C4-B : on voit qu'alors les pentes des courbes sont proportionnelles aux longueurs de chromosome envisagées, comme avec les radiations ionisantes.

Conclusion

Deux effets de la lumière ultraviolette sur la conjugaison ont été démontrés : le premier, bien que résultant de lésions probablement différentes par leur nature, aboutit au même type d'inactivation que celui produit par les radiations ionisantes. Ces lésions sont réparties au hasard sur le chromosome, puisque le degré d'inactivation est proportionnel à la longueur de chromosome. En outre le rapport des efficacités d'inactivation de transfert et de survie est semblable à celui qui a été calculé après irradiation X (Marcovich 1961).

Comme pour les radiations ionisantes, nous avons considéré que l'inactivation a lieu au niveau du transfert, c'est à-dire que les lésions ne sont pas transférées aux zygotes. La remarque restrictive présentée plus haut s'applique ici aussi. Nous aborderons dans la discussion les implications de ces hypothèses en ce qui concerne le sort des lésions, leur effet inhibiteur de la réplication de l'ADN, et leur réparation éventuelle par le mâle ou la femelle.

Le deuxième effet correspond à la diminution de la capacité à conjuguer observée dans la figure C4. Ce facteur augmente avec la dose, mais il est indépendant, pour une dose donnée, des marqueurs considérés. C'est donc une inactivation d'un processus global, antérieur au transfert, tel que la formation des paires effectives ou la mobilisation du chromosome immédiatement avant le transfert.

IV - MECANISME DE L'INTEGRATION

Il est actuellement admis que l'ADN mâle transféré dans le zygote est intégré par des actes de recombinaison (Campbell 1962) dans le génome de la femelle (Siddiqi 1963). Oppenheim et Riley (1967) ont pu distinguer deux étapes, dont la première ne nécessiterait probablement pas de synthèse d'ADN (appariement des deux génomes) ; la deuxième étape, la formation de liaisons covalentes entre les deux ADN, n'a lieu que si les zygotes synthétisent de l'ADN. Ces résultats ont été confirmés par Bressler et coll. (1967), par d'autres techniques. Ces auteurs ont aussi montré, en analysant les clones de recombinants que le segment chromosomique mâle se maintient dans au moins l'une des cellules recombinées, et peut intervenir dans plusieurs actes de recombinaison successifs.

On sait que le système contrôlant la recombinaison intervient aussi dans une partie des processus de réparation de l'ADN.

L'irradiation ultraviolette, peut-être par le biais des phénomènes de réparation, augmente la fréquence des événements de recombinaison (Hayes 1952 ; Curtiss 1968 ; Eventchik, Stacey, Hayes 1969). Nous avons étudié, dans notre système, l'effet des rayons UV sur l'étape recombinaison de la conjugaison.

Les travaux déjà cités (Fuerts et coll. 1956 ; Jacob et Wollman 1955 ; Marcovich 1961 ; Wood et Marcovich 1964 ; Krisch 1965) concernant l'effet de divers types de radiations subies par le mâle avant le croisement, conduisent à la conclusion que les lésions radioinduites bloquent le transfert de la région du chromosome qui leur est distale. On ne retrouve dans le zygote que des régions intactes, pour lesquelles les processus de recombinaison ne sont pas modifiés. Des expériences d'irradiation de la femelle avant le croisement (Marcovich 1961 ; Wood et Marcovich 1964) ont indiqué que ces mêmes lésions qui, chez le mâle, bloquent le transfert, agissent en conduisant à une sélection des recombinants les moins touchés par l'irradiation. Il y a une restauration du matériel génétique de la femelle, par échange avec le matériel mâle non irradié.

Nous avons réalisé des expériences du même type en utilisant la lumière UV (Joset et Wood 1966).

1) Etude des recombinants sélectionnés après croisement entre le mâle irradié et la femelle.

Les résultats (Fig. C5) sont qualitativement identiques à ceux obtenus avec les rayons X ou les particules α, et peuvent être analysés de la même façon : pour un marqueur non sélectionné proximal, le pourcentage de liaison des autres

déterminants génétiques au marqueur de sélection est très peu, ou pas du tout, modifié par l'irradiation. L'indépendance vis à vis de la dose indique qu'aucune lésion susceptible de modifier l'intégration n'existe dans la région chromosomique considérée.

Par contre la liaison apparente d'un marqueur distal au marqueur sélectionné diminue avec la dose et avec la distance séparant ces deux marqueurs. Cette diminution est quantitativement équivalente à l'inactivation de transfert : ainsi la diminution de la transmission du marqueur Trp$^+$ aux recombinants Thr$^+$ Str^r , par exemple, suit une cinétique comparable à la vitesse relative de disparition des recombinants Trp$^+$ Str^r par rapport aux recombinants Thr$^+$ Str^r (Fig. C4-B).

Ces résultats ne permettent pas de savoir si les lésions mises en évidence par des modifications des courbes de gradient, après irradiation du mâle (Fig. C3 et C4) agissent uniquement par blocage du transfert, ou si elles jouent en modifiant les processus de recombinaison dans les zygotes.

2) Irradiation de la femelle avant le croisement

L'expérience complémentaire, qui consiste à irradier la femelle avant le croisement, permet d'introduire directement les lésions dans le zygote sans qu'elles aient subi une modification éventuelle au moment du transfert, et d'étudier leur effet sur le processus de recombinaison. Du fait que la sélection est toujours faite pour un marqueur du mâle, on doit normalement observer des résultats inversés par rapport à ceux qui viennent d'être décrits (Joset et Wood 1966).

La vitesse de disparition avec la dose des recombinants sélectionnés directement (Fig. C6) est inversée par rapport aux résultats obtenus par irradiation du mâle (Fig. C4-A). De même, on observe, par analyse génétique de ces recombinants

(Fig. C7) une augmentation relative du nombre de recombinants ayant intégré une forte proportion du matériel génétique du mâle. Ce résultat exprime le fait que les zygotes qui ont le plus de chance de survivre sont ceux qui ont intégré le plus de matériel mâle, à la place de celui de la femelle, qui porte des lésions. Pour être certain que ces effets n'étaient pas dûs, au moins en partie, à une modification du transfert lui-même, des expériences de cinétique de transfert ont été réalisées. Les temps d'entrée observés ne sont pas modifiés de façon détectable, lorsque la femelle est préalablement irradiée aux UV. La modification du processus de transmission observée correspond bien à une sélection des zygotes qui auront gardé le moins de lésions, ou qui auront éliminé toutes les lésions létales introduites dans l'ADN de la femelle, par remplacement de ce dernier par le matériel du mâle.

V - CONCLUSION

L'inactivation de la conjugaison chez Hfr H par les divers types de radiations utilisés par Marcovich (1961) , Wood et Marcovich (1964), Krisch (1965) et nous-mêmes, a été interprétée selon un modèle relativement simple : au moment du transfert d'un chromosome mâle irradié, les radiolésions constituent un obstacle au transfert de la portion du chromosome distale par rapport à ces lésions. Les segments transférés sont donc indemnes, ce qui explique que leur fréquence d'intégration dans le génôme de la femelle ne soit pas modifiée par l'irradiation.

Les expériences d'irradiation de la femelle indiquent que les lésions qui, induites chez le mâle, aboutissent à un arrêt du transfert, provoquent maintenant une augmentation du nombre d'actes de recombinaison.

Ce modèle est basé sur le postulat que seule l'étape transfert de la conjugaison serait soumise à une polarité stricte (Jacob et Wollman 1958), et que tout processus modifiant cette polarité ne pourrait jouer qu'au niveau du transfert.

L'existence d'une polarité d'intégration a été proposée par Curtiss et all. (1966). Dans ce cas, aucune des expériences décrites, ni aucune de celles effectuées par Marcovich (1961), Wood et Marcovich (1964), ou Krisch (1965), ne permettent de distinguer entre un effet au niveau du transfert ou un effet au niveau de l'intégration. Nous savons que ce dernier peut exister, puisque l'irradiation de la femelle perturbe les fréquences normales de transmission des marqueurs.

Les lésions produites chez le mâle Hfr H par la lumière ultraviolette bloquent deux niveaux du processus de conjugaison : la capacité des mâles à conjuguer, c'est-à-dire à mettre en place les processus préliminaires au transfert, diminue exponentiellement avec la dose. L'inactivation du transfert est comparable à l'effet produit par les radiations ionisantes (Marcovich 1961 ; Wood et Marcovich 1964).

Les lésions introduites dans le zygote par irradiation préalable de la femelle, aboutissent à une sélection des recombinants ayant intégré une plus grande proportion du génôme du mâle. Ceci correspond à l'élimination du matériel génétique de la femelle portant les lésions.

Le caractère Hfr de la souche étudiée apparaît stable vis à vis des radiations. Les lésions produites, quel que soit leur type, ne font que s'opposer au déroulement normal de l'une ou l'autre étape du croisement. La séquence d'injection du chromosome est conservée.

Dans le but de généraliser ces observations, une douzaine environ de mâles Hfr ont été étudiés, quant à leur comportement au point de vue conjugaison après irradiation.

Deux types de mâles ont été choisis : soit des mâles isogènes, soit des mâles d'origines diverses, donc ayant eu une histoire antérieure différente. Ces derniers ont été pris dans la collection du laboratoire, de façon à inclure des souches transférant suivant les deux directions possibles, et à partir d'origines variées.

Deux familles de mâles isogènes ont été étudiées : l'une est formée de 5 souches provenant d'une sélection de Hfr indépendants après irradiation UV de F^+ W 1485 . Ce sont les mâles de la série Ra.

L'autre famille, donnée par le Dr. Broda, est formée de 3 Hfr issus spontanément de F^+ W 1655 (mâles B).

Les caractères de ces souches, ainsi que leur séquence d'injection sont donnés dans l'appendice.

La moitié des mâles étudiés environ répond à l'irradiation de la même façon que Hfr H, et ne seront pas étudiés ici (Espardellier-Joset et Fournier 1966).

Les autres sont induits, par irradiation, à modifier leur séquence de transfert. Nous verrons que vraisemblablement ces derniers se répartissent en deux classes différenciées par le type de la séquence de transfert induite.

Deux souches ont été utilisées essentiellement dans la suite de ce travail : le mâle Ra-1 présentait l'avantage de transférer son chromosome en sens inverse que Hfr H, tout en permettant l'utilisation des mêmes marqueurs génétiques. Le deuxième Hfr, B 11, qui injecte son chromosome dans l'ordre $\underline{Pro}_C$, $\underline{Trp}$, $\underline{His}$, ... $\underline{Leu}$, $\underline{Lac}$, est très stable et a été beaucoup utilisé par Broda, Hayes et leurs collaborateurs.

ooo ooo

ooo

FIGURE C 1

GRADIENT DE TRANSMISSION DU CHROMOSOME DE Hfr H

Une culture du mâle Hfr H en phase exponentielle de croissance en milieu complet est croisée avec la souche F^- PA 309, à raison de 2.10^7 mâles et 2.10^8 F^- /ml. La suspension est maintenue 90 min à 37°C sans agitation, puis placée à 0°C. Elle est alors diluée de façon convenable, et des aliquots sont étalés dans des boites de Pétri contenant les milieux sélectifs correspondant aux recombinants cherchés.

Hfr H $\underline{Str}^s$

PA 309 $\underline{Thr}$ $\underline{Leu}$ $\underline{Trp}$ $\underline{His}$ $\underline{Arg}_B$ $\underline{Str}^r$

Recombinants :

$\underline{Thr}^+$ $\underline{Str}^r$; $\underline{Leu}^+$ $\underline{Str}^r$; $\underline{Trp}^+$ $\underline{Str}^r$; $\underline{His}^+$ $\underline{Str}^r$;

$\underline{Arg}_B$ $^+\underline{Str}^r$

Les colonies sont dénombrées après 48 h de croissance à 37°C. Les fréquences de transmission sont obtenues en rapportant la quantité de recombinants de chaque type formés au nombre de mâles présents dans la suspension au début du croisement. Le gradient représente le logarithme de ces fréquences de transmission en fonction de la distance des marqueurs à partir de l'origine de transfert.

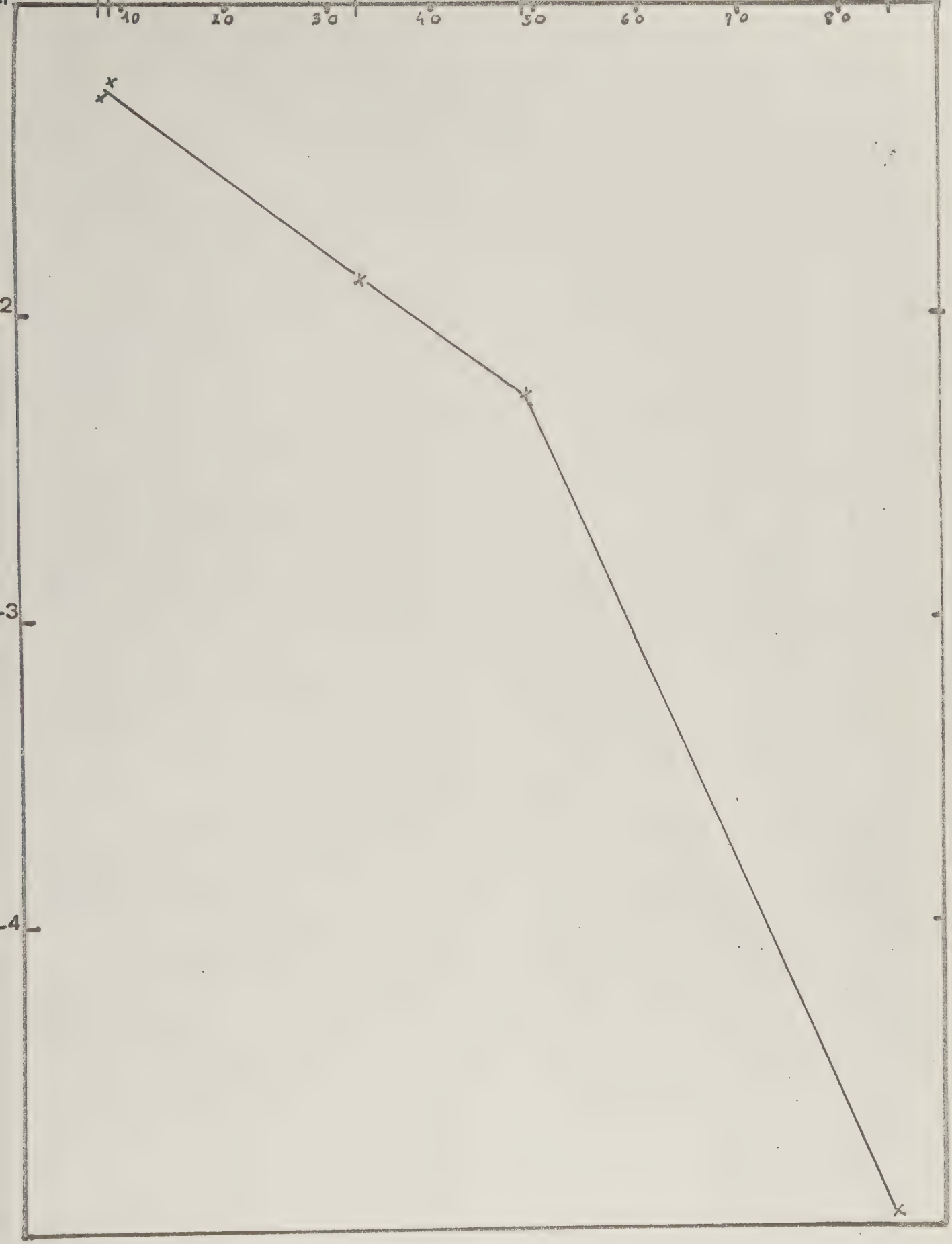


Fig C1

FIGURE C 2

INACTIVATION DE LA TRANSMISSION DU MATERIEL GENETIQUE DE Hfr H PAR IRRADIATION PREALABLE DU MALE AUX RAYONS γ du ^{60}Co

Une culture en phase exponentielle de croissance du mâle Hfr H, à 2.10^8 cell./ml, est irradiée dans son milieu de croissance, par doses cumulatives, à 0°C. A chaque dose, la survie est déterminée immédiatement et un croisement est effectué dans les conditions définies dans la légende de la figure 1.

Les courbes de "survie" de la transmission des marqueurs correspondent aux rapports des quantités obtenues à chaque dose à celle obtenue dans le témoin, pour chaque type de recombinants, en fonction de la dose.

Mâle Hfr H

Femelle PA 309

Temps d'entrée des marqueurs :

Thr	Leu	Trp	His	Arg_B
8 min	9 min	33min	48min	85 min

Recombinants sélectionnés :

$Thr^+ Str^r$; $Leu^+ Str^r$; $Trp^+ Str^r$; $His^+ Str^r$;

$Arg_B^+ Str^r$

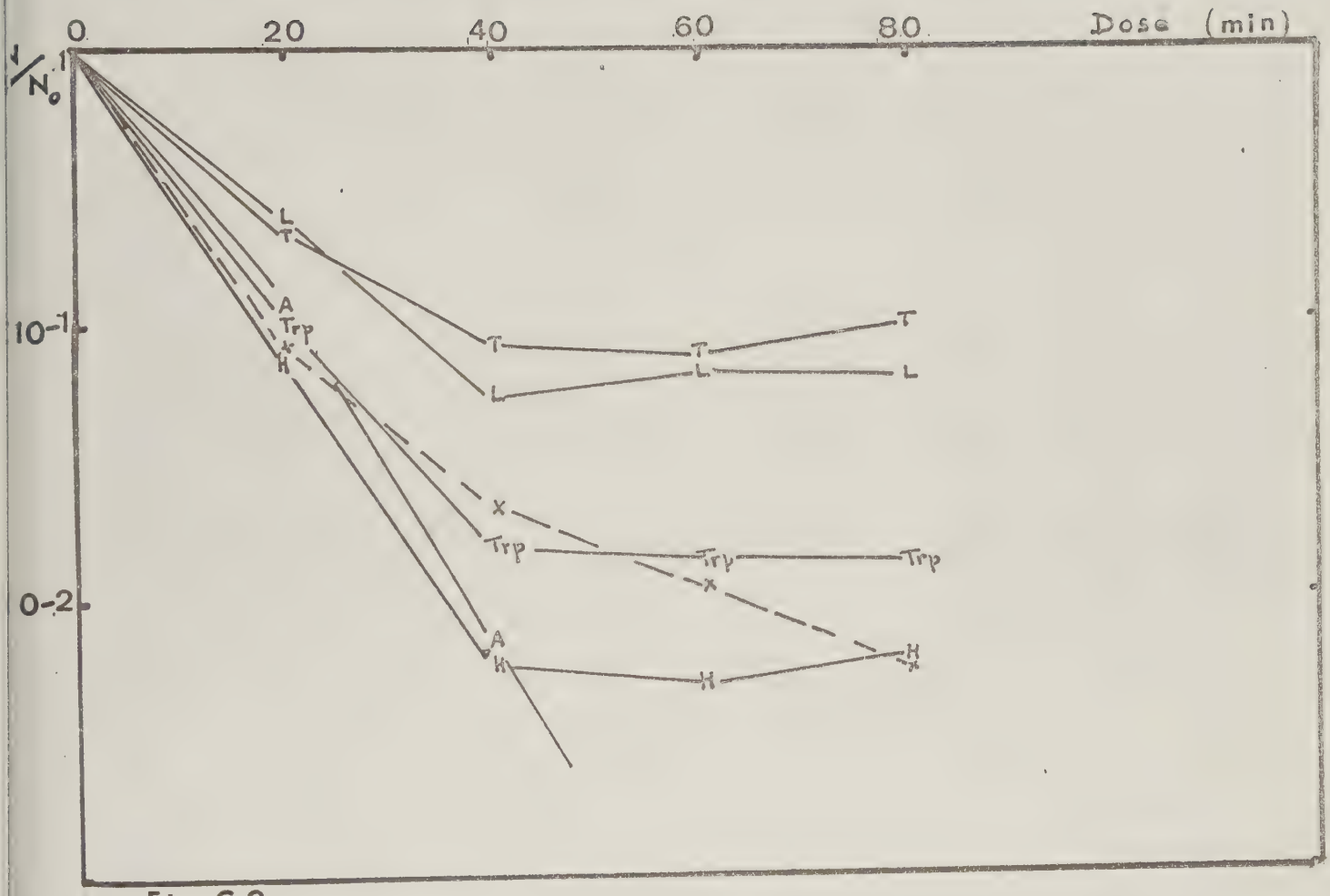


Fig C 2

FIGURE C 3

EFFET DE L'IRRADIATION DU MALE Hfr AUX UV

Une suspension de Hfr H en phase exponentielle de croissance est lavée et suspendue dans de l'eau physiologique, à 2.10^8 cell./ml. L'irradiation est effectuée à température ambiante par doses cumulatives. La suspension est agitée au cours de l'irradiation, et maintenue dans une obscurité relative. Les mesures de survie des mâles, les croisements et les étalements pour la titration des recombinants sont effectués comme pour l'expérience précédente (Fig. C2).

A - Inactivation de la transmission des marqueurs en fonction de la dose. Les fréquences sont obtenues en rapportant le nombre de recombinants de chaque type au nombre total de mâles de la suspension avant irradiation. Les points obtenus à la dose 0 représentent le gradient de transfert normal.

B - "Survie" de la transmission des marqueurs. Les survies sont obtenues en rapportant les nombres de recombinants à chaque dose au nombre obtenu dans le témoin.

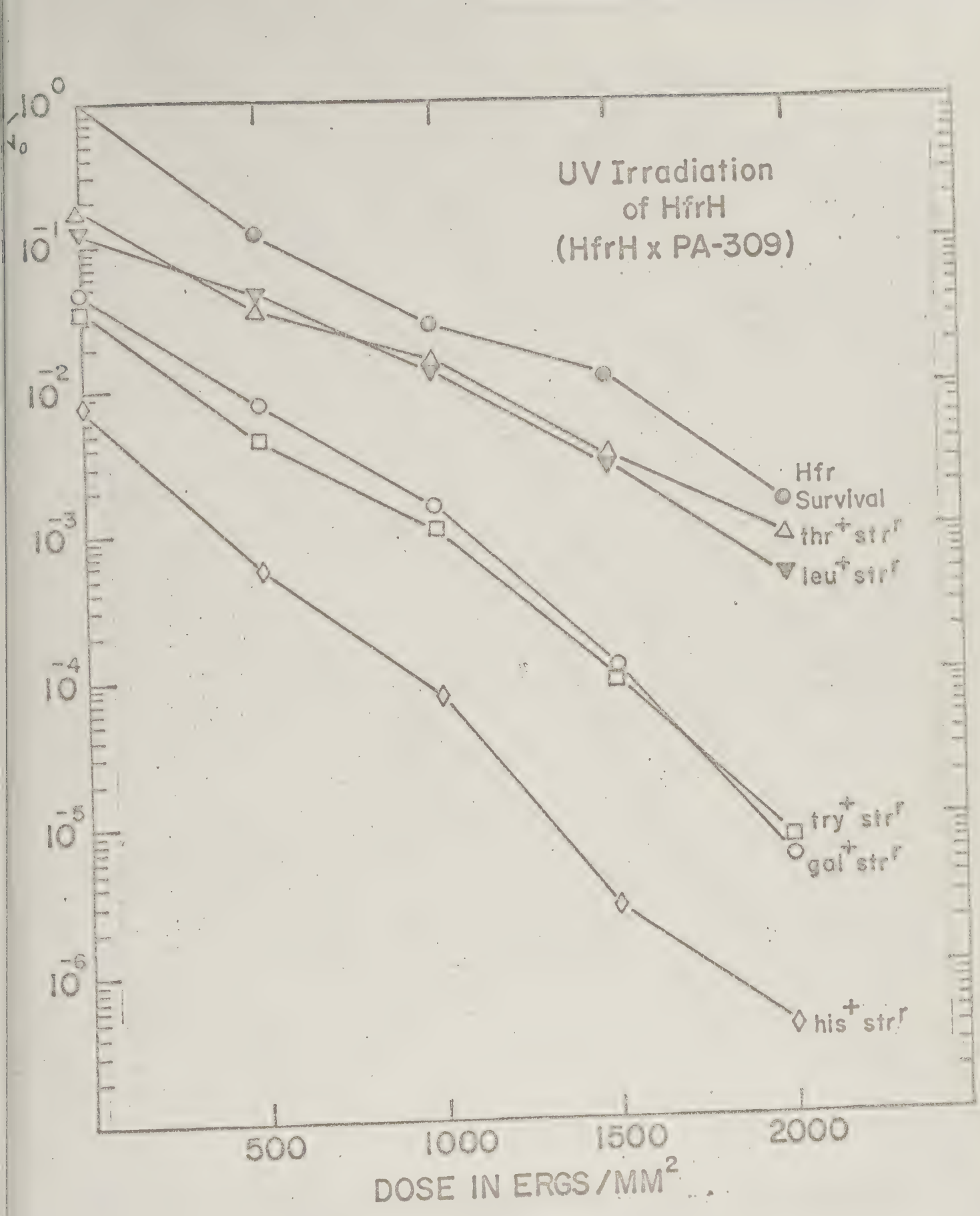

UV Irradiation
of HfrH
(HfrH x PA-309)
10^0
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}
N/N_0
Hfr
Survival
$thr^+ str^r$
$leu^+ str^r$
$try^+ str^r$
$gal^+ str^r$
$his^+ str^r$
500
1000
1500
2000
DOSE IN ERGS/MM^2

Fig C 3-A

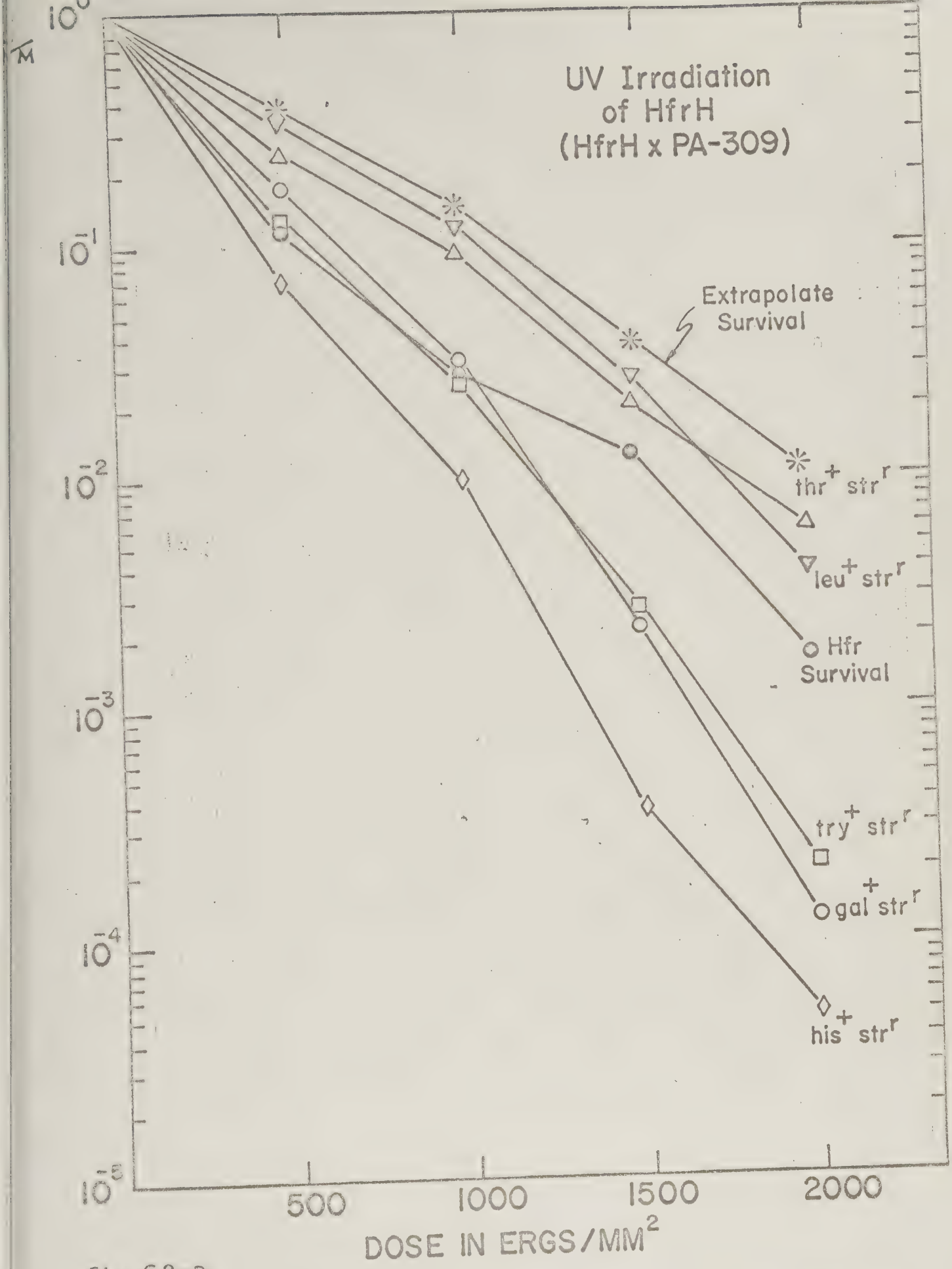

UV Irradiation
of HfrH
(HfrH x PA-309)
Extrapolate
Survival
thr+ str r
leu+ str r
Hfr
Survival
try+ str r
gal+ str r
his+ str r
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
10^-4
10^-5
500
1000
1500
2000
DOSE IN ERGS/MM^2

Fig C3-B

FIGURE C 4

A - VARIATION DU GRADIENT DE TRANSMISSION EN FONCTION DE LA DOSE RECUE PAR LES MALES

L'expérience de la figure C3 est représentée par la variation des fréquences de transmission (Nombre de recombinants/nombre total des mâles) en fonction de la distance des marqueurs à partir de l'origine de transfert. Les courbes ont été prolongées jusqu'à l'origine de transfert, donnant la variation de la capacité à conjuguer à chaque dose. Dans le témoin, environ 25 % des mâles ont transmis leur chromosome. La survie de cette capacité est indiquée dans la Figure C3-B ("extrapolate survival").

(1) 500 erg/mm^2
(2) 1000 erg/mm^2
(3) 1500 erg/mm^2
(4) 2000 erg/mm^2

B - SURVIE DE LA TRANSMISSION DES MARQUEURS APRES CORRECTION POUR L'INACTIVATION DE LA CAPACITE A CONJUGUER

Les facteurs d'inactivation représentent l'inverse de la survie de la capacité à conjuguer. Chaque point des courbes de la Figure C3-B a été multiplié par le facteur d'inactivation de la dose correspondante. Ceci permet de comparer les effets de la dose sur des suspensions comprenant le même nombre de mâles aptes à conjuguer par unité de volume.

C - VARIATION DU GRADIENT DE TRANSMISSION DE Hfr H APRES IRRADIATION DU MALE PAR LE 232Po

Figure tirée de Wood et Marcovich (1964). Même présentation que dans la Figure C4-A.

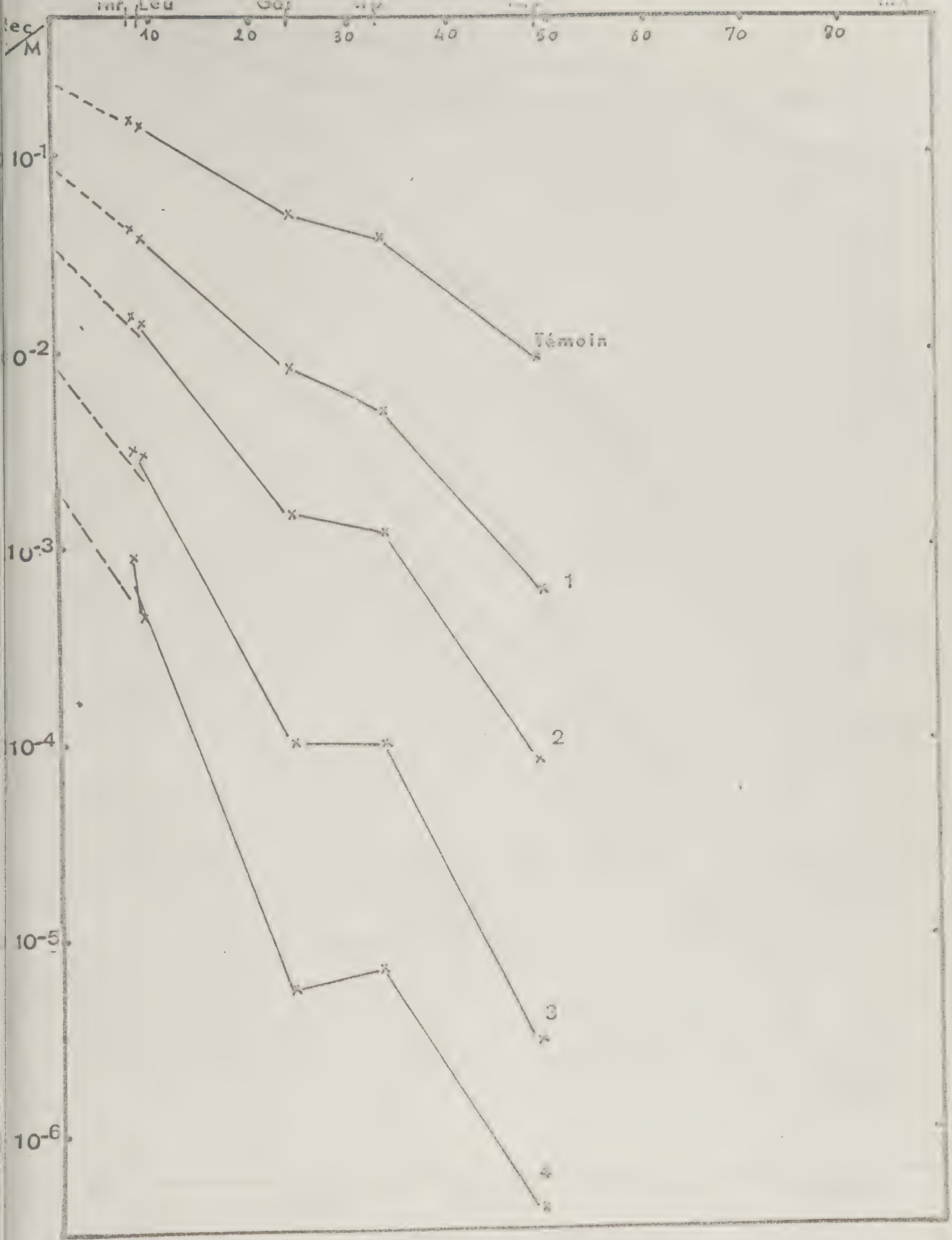


Fig C 4-A

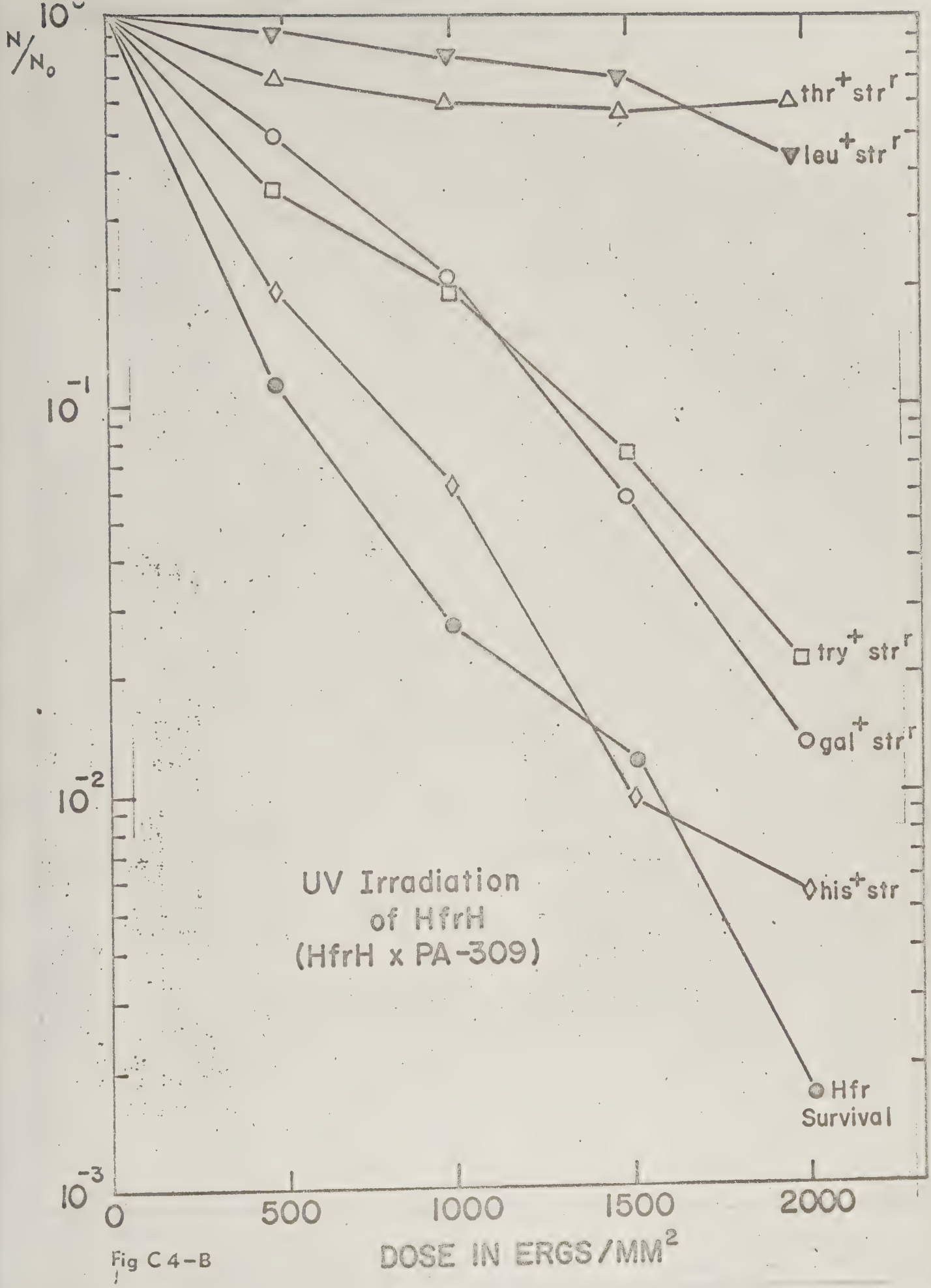

N/N0
10^0
10^-1
10^-2
10^-3
thr+ str^r
leu+ str^r
try+ str^r
gal+ str^r
his+ str
Hfr Survival
UV Irradiation
of HfrH
(HfrH x PA-309)
0
500
1000
1500
2000
DOSE IN ERGS/MM^2

Fig C 4-B

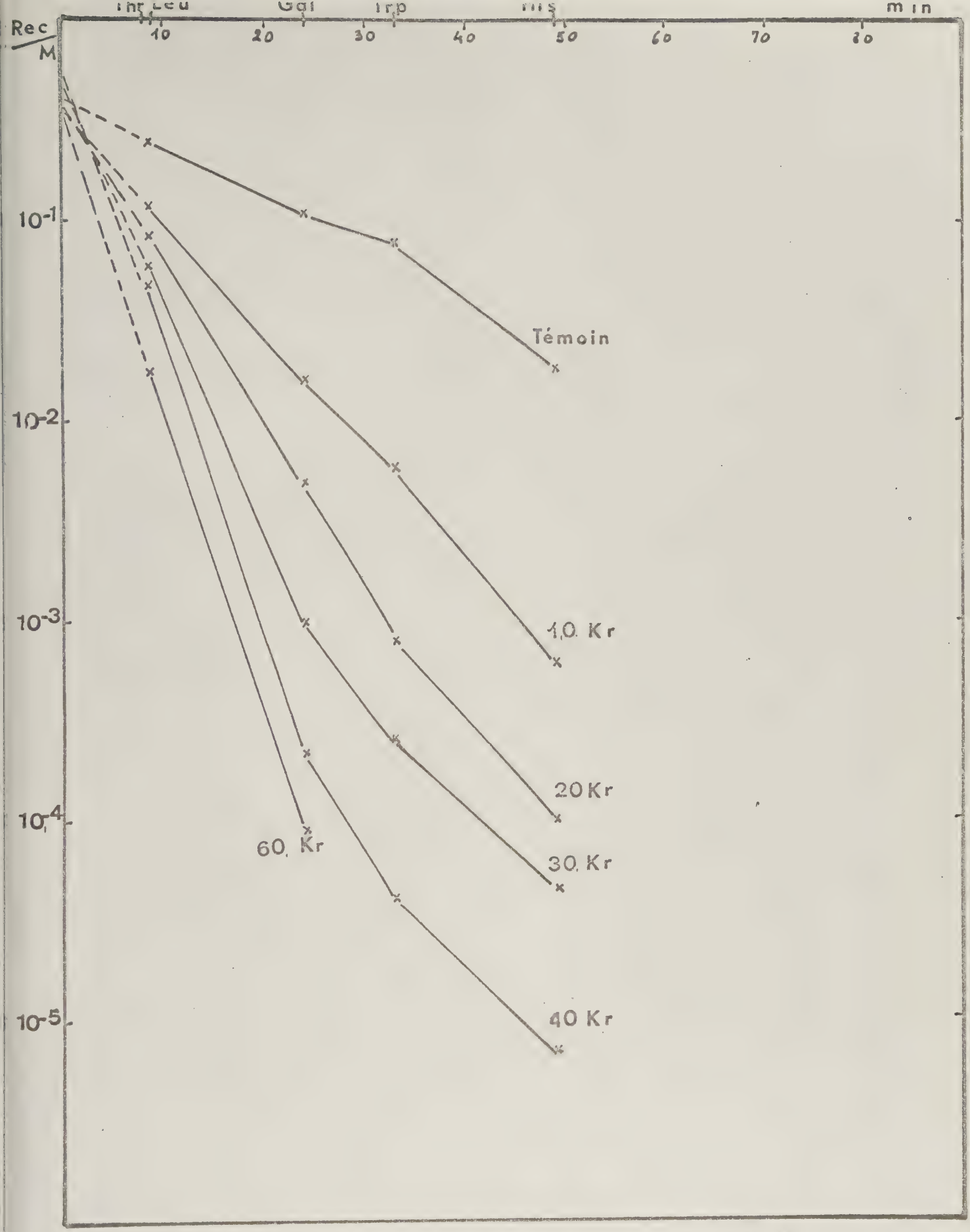

Rec
M
10
20
30
40
50
60
70
80
min
10-1
10-2
10-3
10-4
10-5
Témoin
10 Kr
20 Kr
30 Kr
40 Kr
60 Kr

Fig C4-C

FIGURE C 5

VARIATION DU DEGRE DE LIAISON DES MARQUEURS DU MALE CHEZ LES RECOMBINANTS APRES IRRADIATION UV DU MALE

150 à 200 recombinants de chaque type de l'expérience décrite dans les Figures C3 et C4 sont répliqués pour former des grilles sur des boites de Pétri contenant les milieux sélectifs correspondants, de manière à purifier les clones.

Après 20 h de croissance à 37°C, ces grilles sont répliquées sur les milieux permettant l'analyse des autres caractères étudiés.

Les résultats sont portés en pourcentages de recombinants d'un type donné ayant hérité chacun des autres caractères du mâle analysé, en fonction des doses reçues par le mâle avant le croisement.

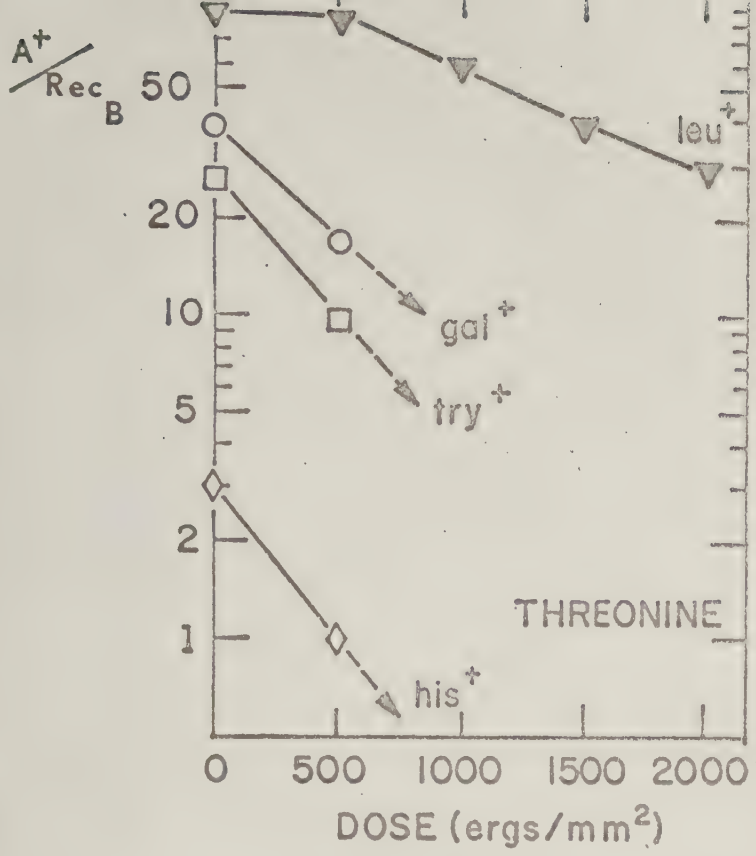
FIGURE C 5

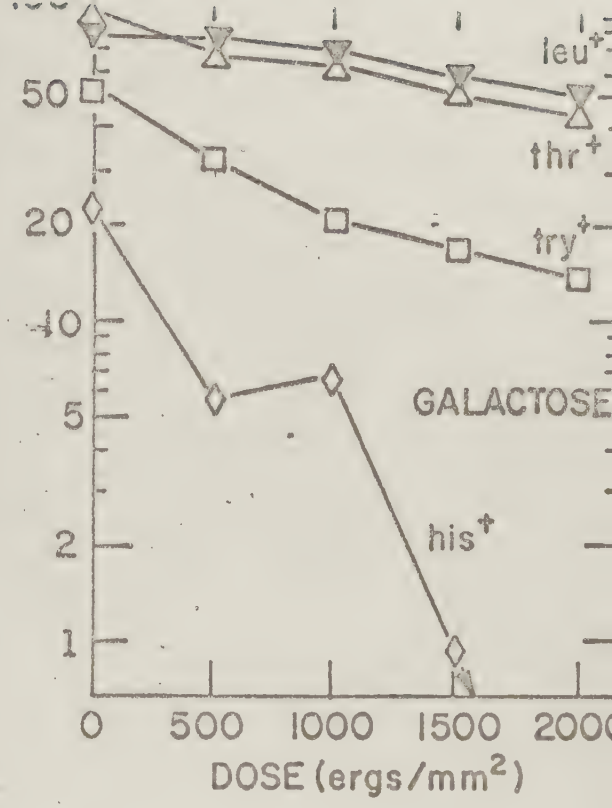
VARIATION DU DEGRE DE LIAISON DES MARQUEURS DU MALE CHEZ LES RECOMBINANTS APRES IRRADIATION UV DU MALE

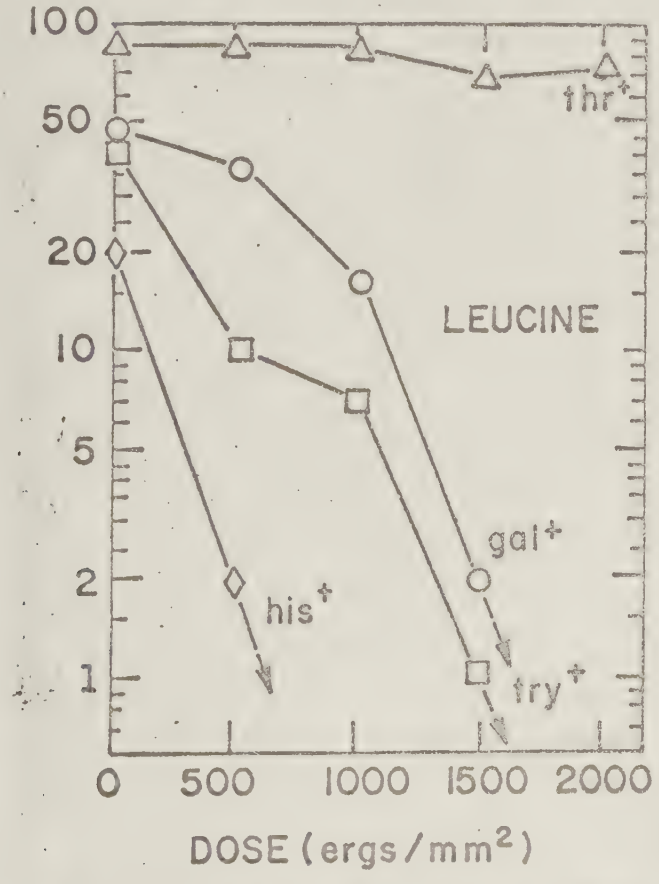
150 à 200 recombinants de chaque type de l'expérience décrite dans les Figures C3 et C4 sont répliqués pour former des grilles sur des boites de Pétri contenant les milieux sélectifs correspondants, de manière à purifier les clones.

Après 20 h de croissance à 37°C, ces grilles sont répliquées sur les milieux permettant l'analyse des autres caractères étudiés.

Les résultats sont portés en pourcentages de recombinants d'un type donné ayant hérité chacun des autres caractères du mâle analysé, en fonction des doses reçues par le mâle avant le croisement.







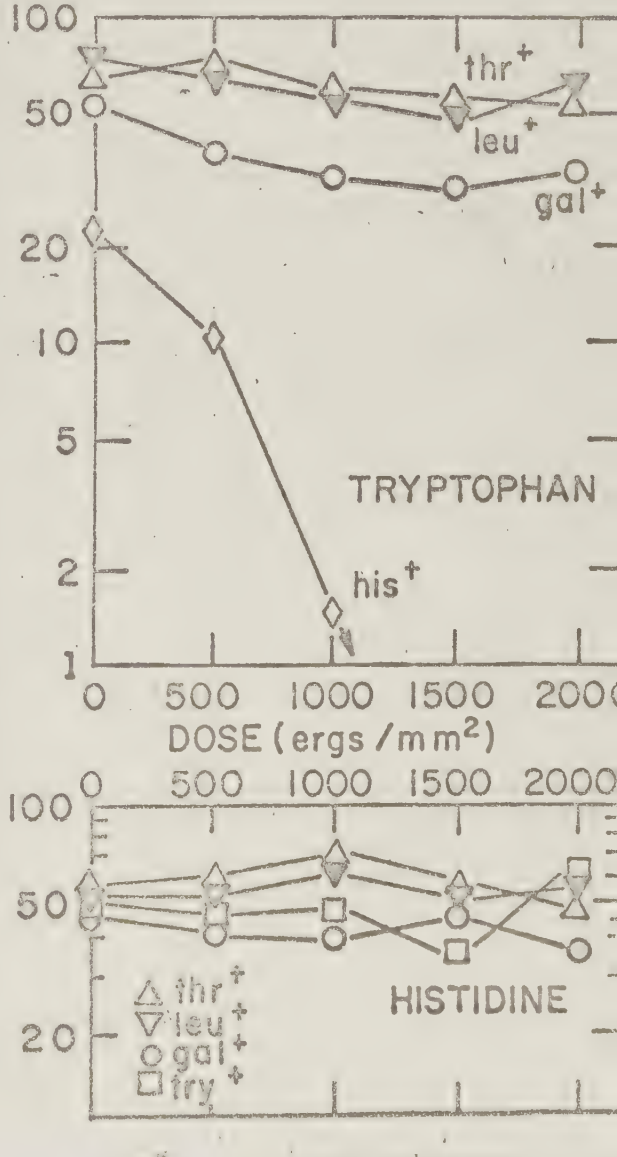


Fig C5 ULTRAVIOLET IRRADIATION OF HfrH (HfrH x PA-309)

FIGURE C 6

VARIATION DU GRADIENT DE TRANSMISSION APRES IRRADIATION UV DE LA FEMELLE AVANT LE CROISEMENT

Une culture en phase exponentielle de croissance de la femelle PA 309 est irradiée dans les conditions décrites précédemment (Fig. C3), et croisée avec le mâle Hfr H dans les conditions standard, sauf que l'on met $1/F^-$ pour 10 Hfr.

Les résultats sont portés en fréquences de transmission (nombre de recombinants/nombre total de F^-) en fonction de la distance des marqueurs à l'origine d'injection du mâle.

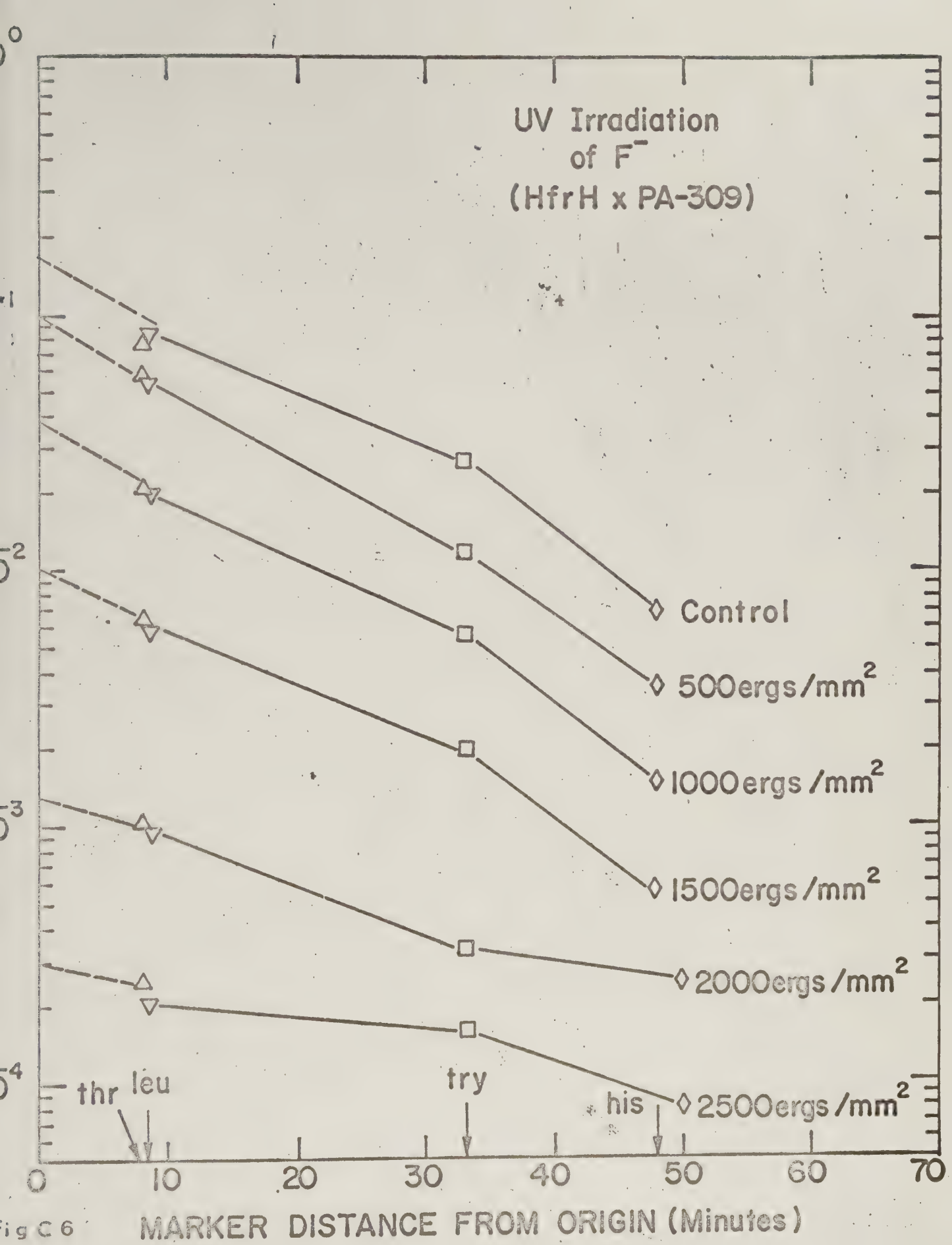

UV Irradiation
of F⁻
(HfrH x PA-309)
Control
500ergs/mm²
1000ergs/mm²
1500ergs/mm²
2000ergs/mm²
2500ergs/mm²
thr
leu
try
his
0
10
20
30
40
50
60
70
MARKER DISTANCE FROM ORIGIN (Minutes)

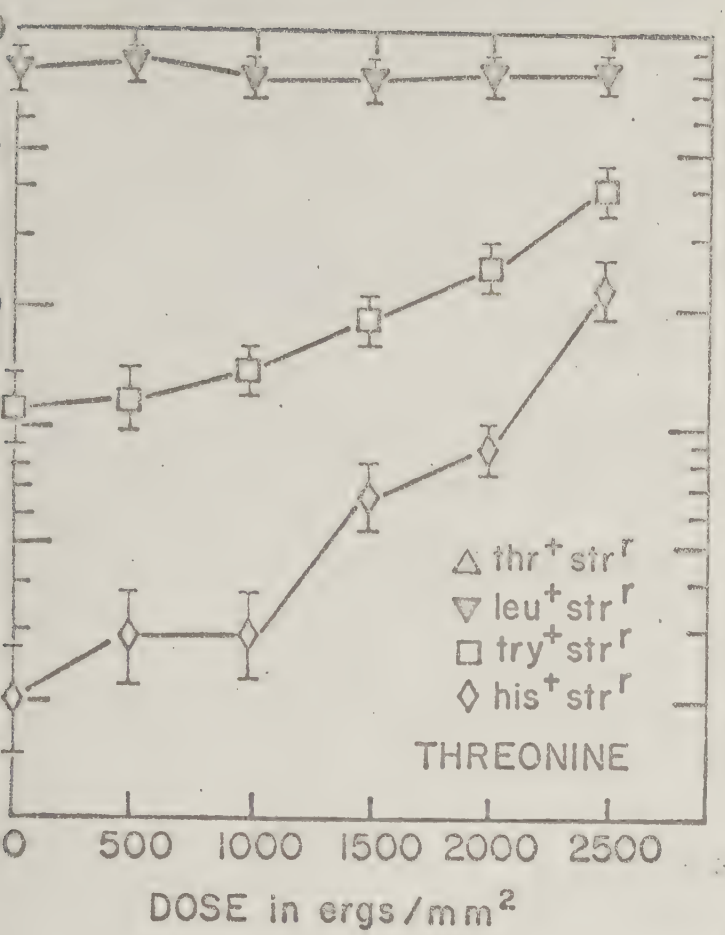
Fig C 6

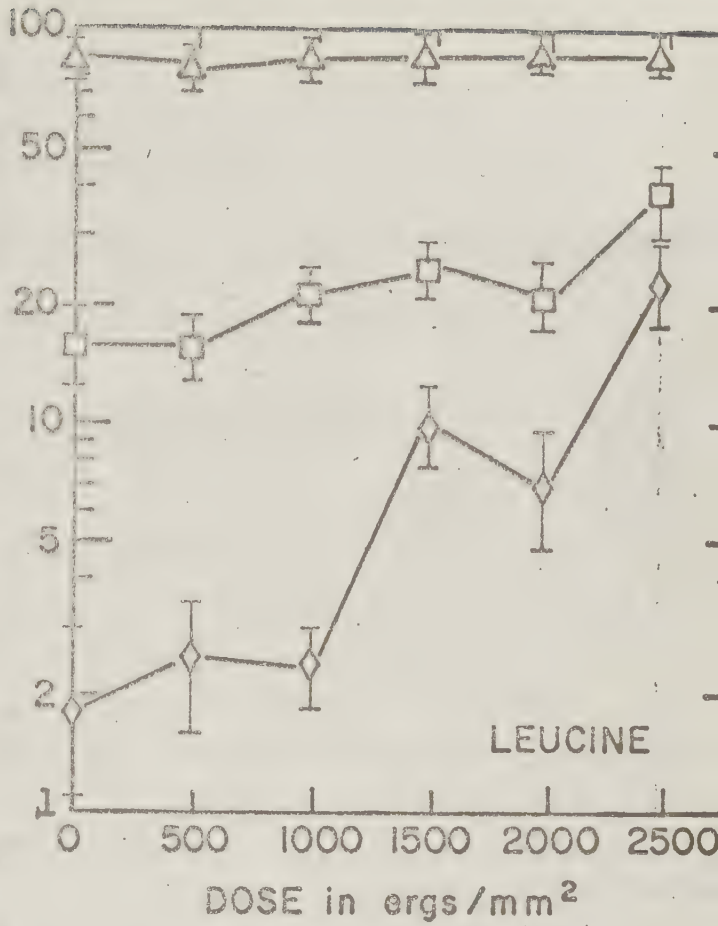
FIGURE C 7

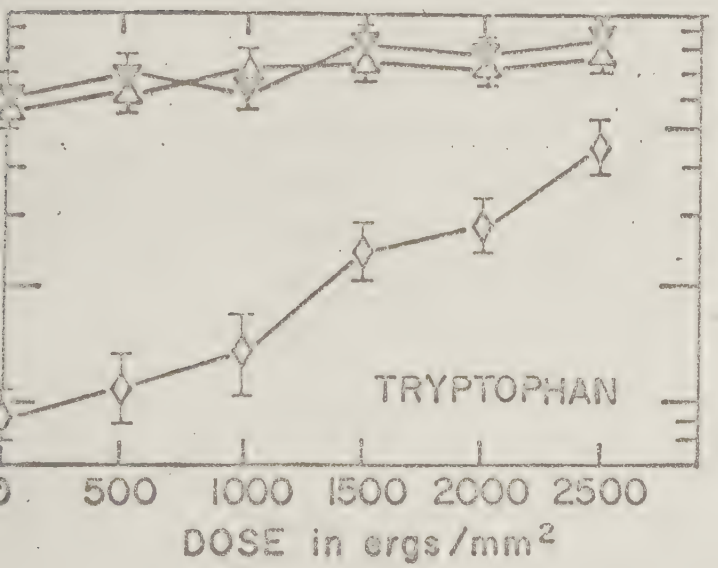
VARIATION DU DEGRE DE LIAISON APPARENT DES MARQUEURS DU MALE CHEZ LES RECOMBINANTS APRES IRRADIATION DE LA FEMELLE

150 à 200 colonies de chaque type de recombinants de l'expérience de la Figure C6 sont repliquées puis répliquées comme pour l'expérience de la Figure C5.

Les résultats sont donnés en pourcentage de recombinants de chaque type ayant acquis l'un des autres caractères du mâle, en fonction de la dose reçue par la femelle.







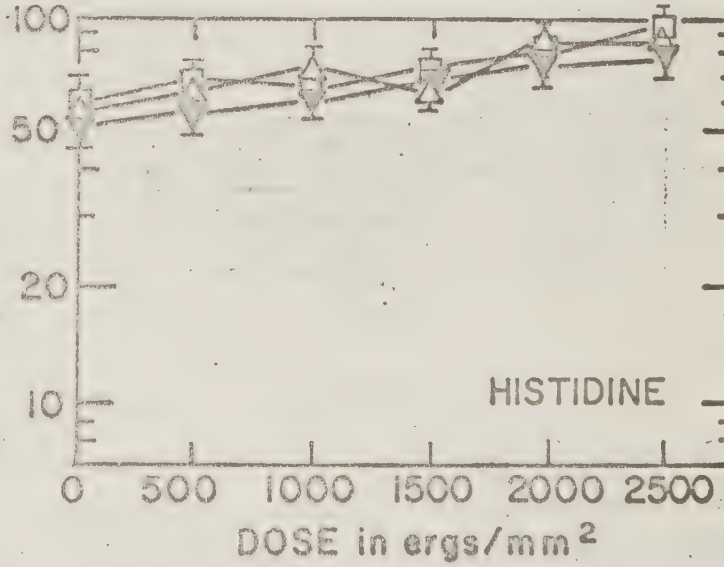


Fig C 7 ULTRAVIOLET IRRADIATION OF F⁻
(HfrH x PA-309)

C H A P I T R E D

INDUCTION A HAUTE FREQUENCE D'UNE MODIFICATION DE LA SEQUENCE DE TRANSFERT DU MALE E. COLI Hfr Ra-1

I - MISE EN EVIDENCE D'UNE ANOMALIE DE TRANSFERT induite par l'irradiation, chez Ra-1.

1.- Cinétique de transfert de Hfr Ra-1

La localisation précise de l'origine de transfert du Hfr Ra-1 a été obtenue par des expériences de cinétique d'entrée, au cours de croisements avec la souche F^- PA 309 (Fig. D1-A). Les temps d'entrée, déterminés à partir de quatre expériences similaires, sont les suivants (Joset et all. 1964) His 23 min ; Irp 36 min ; Thr 65 min ; Arg_B 78 min. Les intervalles entre les marqueurs correspondent aux distances données par Taylor (1970) dans la carte du chromosome de Coli.

Des croisements ultérieurs avec des souches femelles portant les marqueurs Lys_A ou Ser-Gly ont indiqué que l'origin de transfert de Ra-1 est situé entre ces deux marqueurs. La différence entre la distance ainsi déterminée, de 16 min. environ (15 à 17) entre l'origine et His, et la détermination obtenue par les expériences de cinétique, 23 min., correspond au temps nécessaire aux étapes de la conjugaison précédant le transfert (4 à 6 min.) (De Haan et Gross 1962).

2.- Irradiation de Ra-1 avant la conjugaison

Les résultats d'une expérience de conjugaison avec des mâles Ra-1 préalablement irradiés aux rayons X sont donnés dans la figure D2. La fréquence de transmission des marqueurs diminue exponentiellement avec la dose (Fig. D2-A).

Contrairement à ce qui a été observé après irradiation de Hfr H (Fig. C4-A, Chap. C), la relation simple de proportionnalité entre sensibilité de transfert et distance à l'origine des marqueurs, semble avoir disparu. La séquence que l'on pourrait déduire de ces courbes en classant les caractères par sensibilités croissantes, est inversée par rapport à l'ordre de transfert de Ra-1, du moins pour les cinq marqueurs étudiés.

La représentation de ces résultats sous la forme de la variation du gradient de transfert avec la dose (Fig: D2-B) rend plus explicite un des aspects du phénomène : au fur et à mesure que la dose augmente, les courbes deviennent de plus en plus concaves.

A la dernière dose donnée, il apparaît, en valeurs absolues, plus de recombinants $\underline{Arg}^+_B\ \underline{Str}^r$ que de $\underline{His}^+\underline{Str}^r$, alors que leur rapport est d'environ 1 pour 30 sans irradiation. Cette résistance de l'inactivation de transmission se retrouve pour les marqueurs Thr et Trp, bien qu'à un degré moindre. Une représentation similaire après irradiation de Hfr H montre des courbes linéaires dont la pente augmente avec la dose (Fig. C4-A après irradiation UV).

La régularité de la variation observée, aussi bien en fonction de la dose que de la séquence des marqueurs sur le chromosome suggère la possibilité d'une transformation progressive de la séquence de transfert dans la population : les marqueurs transférés en tête par Ra-1 (His par exemple), apparaissent comme distaux après irradiation, et inversement.

Si l'on admet un mécanisme d'inactivation de transfert identique à celui observé chez Hfr H, on peut alors expliquer les courbes obtenues comme étant la superposition de l'inactivation de transfert de deux types de mâles inverses, dont les proportions varieraient régulièrement avec la dose : partant

d'une population homogène de mâles transférant dans les sens O, His, Trp, Arg_B , on arrive à une population mixte formée des mâles précédents et de mâles injectant dans le sens O, Arg_B , Leu , Trp , His , que nous avons appelés mâles "inversés". Il semble que la proportion de mâles inversés varie régulièrement avec la dose donnée.

Cette hypothèse a été confirmée par deux types de résultats.

3.- Cinétique d'entrée des marqueurs

Elle a été étudiée sur une population de Ra-1 irradiée immédiatement avant le croisement. La figure D1-B donne un résultat typique, obtenu ici après irradiation par une faible dose de rayons UV (500 ergs/mm^2 , laissant une survie de 41 %). Deux faits sont remarquables : les fréquences de transmission maximales, données par les plateaux, sont très modifiées par rapport aux fréquences normales, le marqueur Arg_B venant en tête, alors qu'il a normalement la plus faible fréquence. Ce résultat est en accord avec ceux de la figure D2. En outre, il apparaît plus de recombinants Arg_B^+ Str^r après irradiation que dans le témoin (presque deux fois pour cette expérience). Le deuxième fait concerne les temps d'entrée déterminés d'après ces courbes. Ils sont les suivants, approximativement : Arg_B : 11 min. , Thr : 24 min. , His : 28 min. , Trp : 60 min. Le changement le plus important apparaît pour les marqueurs Arg_B et Thr, qui entrent, après irradiation, beaucoup plus tôt. D'autres expériences analogues montrent que les temps d'entrée observés dépendent des doses reçues par le mâle, mais que le déplacement des Arg_B et Thr Leu vers les temps courts est un facteur constant.

4.- Analyse des recombinants formés après irradiation de Ra-1

L'étude de l'héritage génétique des recombinants sélectionnés au cours d'un croisement avec Hfr H irradié montre exclusivement une perturbation de la liaison apparente des marqueurs distaux par rapport au marqueur de sélection (Fig. C5). Dans le cas de Ra-1, on observe une perturbation générale de la transmission simultanée de deux marqueurs, quels qu'ils soient. D'une façon générale, on constate une diminution plus rapide de la liaison de His aux autres marqueurs et une disparition plus lente du marqueur Arg_B. La figure D3 montre une expérience dans laquelle les résultats sont particulièrement nets : His et Arg_B (Fig. D3-A et D3-E) se comportent comme des marqueurs initiaux, dont la liaison avec les autres marqueurs diminue avec la dose. Thr et Leu (Fig. D3-C et D3-D) seraient transférés après Arg_B et avant Trp et His. Le marqueur Trp (Fig. D3-B) semble distal par rapport à tous les autres marqueurs. La contradiction apparente de ces résultats est levée si l'on admet que la majorité de la population qui participe effectivement au transfert après irradiation, injecte son chromosome en sens inverse de Ra-1.

L'analyse de la constitution génétique des recombinants Arg_B^+ Str^r isolés au cours d'une expérience de cinétique (Fig. D2-B) montre qu'après irradiation du mâle, aucun de ces recombinants formés pendant les 60 premières minutes de croisement n'est prototrophe pour His, alors que His entre normalement à environ 30 minutes. Sans irradiation, environ 50 % des recombinants Arg_B^+ Str^r sont en même temps His^+. Ce résultat est encore une indication qu'après irradiation, Arg_B est transféré en tête par au moins la majorité des Hfr, qui alors n'injectent pas His avant 60 minutes.

Des résultats qualitativement similaires ont été obtenus avec tous les types de radiations utilisés : ultraviolette, ionisantes (X, γ, α) ou phosphore radioactif incorporé dans l'ADN. Dans la suite de ce travail les rayons γ seront plus fréquemment utilisés pour des raisons de commodité et de reproductibilité du débit. Dans un certain nombre de cas, il a été vérifié que le résultat ne dépendait pas du type de radiations.

L'analyse que nous avons décrite de la séquence de transfert de Ra-1 après irradiation est compatible avec l'hypothèse de l'induction ou de la sélection d'un type de transfert nouveau par l'irradiation. Il a semblé intéressant de savoir si cette propriété était propre à Ra-1, ou avait un caractère plus général, en particulier par l'étude de mâles isogènes de Ra-1.

II - COMPORTEMENT DE QUELQUES SOUCHES ISOGENES DE Ra-1

Il s'agit des souches Ra-2 , Ra-9 , Ra-11 et Ra-13 (Espardellier-Joset et Fournier 1966). Aucune de ces souches ne présente le type d'inactivation obtenu avec Hfr H. Bien que leurs séquences de transfert individuelles soient différentes, toutes ont un taux d'inactivation de transmission minimum pour le marqueur $\underline{Arg}_B$. Une seule exception, Hfr Ra-9 , chez lequel le marqueur $\underline{Pur}_G$ présente la plus faible inactivation, $\underline{Arg}_B$ venant immédiatement après.

Une expérience typique d'irradiation aux rayons X de la souche Ra-11 est présentée dans la figure D4. La figure D4-A indique la variation du nombre absolu de recombinants de chaque type en fonction de la dose. La courbe de survie des mâles est aussi indiquée. Cette représentation montre l'inversion progressive de la sensibilité de transmission de la région $\underline{Trp}$ - $\underline{Pro}_B$ $\underline{Thr}$ - $\underline{Arg}_B$. La figure D4-B, déduite de la première par normalisation du nombre de recombinants au nombre total de mâles

fait apparaître la distorsion du gradient après irradiation. La distorsion est la plus marquée pour le gène $\underline{Arg}_B$, et va en décroissant pour les gènes Thr , $\underline{Pro}_B$ et Trp. La transmission de Ilv n'est pas affectée par cette modification. Celle de $\underline{Pur}_B$ si elle l'est, l'est peu. Ces résultats sont compatibles avec la modification de la séquence de transfert décrite pour la souche Ra-1. L'origine de transfert radioinduite se trouve entre $\underline{Arg}_B$ qui devient un marqueur proximal, et Ilv qui reste un marqueur distal. La direction de transfert est d'$\underline{Arg}_B$ vers Thr, $\underline{Pro}_B$, Trp.

Le même type de représentation que dans la figure D4-B a été utilisé dans le cas de la souche Ra-13, qui injecte normalement Ilv en tête (Fig. D5-A). La transmission de ce marqueur est inhibée de façon très rapide, alors que celle de $\underline{Arg}_B$, distant seulement de 5 min., l'est peu. Ilv se comporte après irradiation comme un marqueur transféré en queue du chromosome. L'explication de ces résultats par l'hypothèse proposée pour Ra-1 voudrait qu'ici la direction de transfert ne soit pas modifiée. Seule l'origine serait déplacée.

Le tableau D1 indique de façon résumée la réponse de ces souches à l'irradiation. Dans tous les cas, la survie des mâles est d'environ 10^{-3} . Les résultats sont les mêmes quelles que soient les radiations utilisées. Les chiffres donnés, proportionnels au degré d'inactivation de la transmission des divers marqueurs, permettent une comparaison directe de leur taux d'inactivation en fonction de leur position sur le chromosome.

Ainsi le degré d'inactivation de transmission des marqueurs de Hfr H, donné à titre de comparaison, augmente proportionnellement à leur distance à l'origine de transfert (voir Chap. C).

Dans l'ensemble, on observe deux directions d'augmentation du taux d'inactivation : l'une dans le sens du transfert normal de la souche étudiée, l'autre dans le sens $\underline{Arg}_B$, $\underline{Thr}$, $\underline{Leu}_B$, $\underline{trp}$. Le sens d'injection envisagé dans le cas de Ra-1 semble s'appliquer à toutes ces souches. L'irradiation induirait ces 5 Hfr à transférer leur matériel génétique suivant une même séquence, différente de celle de chacune. L'origine induite serait située très vraisemblablement entre les marqueurs $\underline{Liv}$ et $\underline{Arg}_B$.

Dans chaque cas, l'analyse de la transmission d'autres marqueurs du mâle aux recombinants sélectionnés, a confirmé cette hypothèse. Les résultats obtenus sont du même type que ceux qui ont été décrits pour Ra-1 (fig. III). Le schéma de transmission du reste du génôme aux recombinants peut s'expliquer par superposition de deux types de réponses correspondant à deux modes d'injection, celui du mâle non irradié et celui qui a été observé après irradiation de Ra-1.

III - ESTIMATION DE L'EFFICACITE D'INDUCTION

Les Hfr nouveaux peuvent provenir de trois sources :

1) Transformation préférentielle des F^+ existant normalement dans la population ;

2) Sélection, par exemple par résistance différentielle aux radiations, d'une faible quantité de Hfr inversés préexistants à l'irradiation ;

3) Transformation des mâles de type normal en mâles inversés.

Les deux premières possibilités peuvent être éliminées :

1) La transformation exclusive des F^+ présents parmi les mâles Ra-1 pourrait expliquer le faible degré de diminution de transfert du marqueur Arg_B . Mais elle est incompatible avec deux autres résultats :

a) la quantité absolue de recombinants distaux observés est beaucoup plus élevée que celle des F^+ habituellement présents dans une population de Hfr.

b) Cette hypothèse ne fournit aucune explication à la disparition rapide des recombinants proximaux (His^+ Str^r).

2) Sélection de mâles "anormaux" préexistants

Plusieurs raisons indiquent que l'hypothèse d'une sélection d'un type de mâles préexistants à l'irradiation est inacceptable, ou au moins insuffisante : pour que leur séquence de transfert puisse être observée, il faut que la quantité des mâles inversés devienne, du fait de l'irradiation, au moins du même ordre de grandeur que celle des Ra-1 normaux. Ceci ne pourrait se produire que si ils étaient relativement plus radiorésistants, au moins quant à leurs propriétés de conjugaison, que Ra-1. Si l'on admet que les lésions conduisant à la mort et à l'inactivation de transfert ont une nature commune, comme le suggèrent les résultats obtenus par irradiation de Hfr H (voir Chap. C et Marcovich 1961), cette radiorésistance devrait se manifester au niveau de la courbe de survie des mâles. La fraction radiorésistante étant minoritaire, elle n'apparaîtra qu'une fois que seule une fraction de même grandeur ou plus faible de la population sensible survivra à l'irradiation. La fraction résistante devenant alors majoritaire et étant inactivée moins vite, la pente de la courbe reflètera la sensibilité de cette fraction. On devra donc observer une courbe de survie à deux pentes, représentant la mortalité des fractions sensible puis résistante. L'extrapolation à l'axe des ordonnées de la deuxième partie de la courbe indique la proportion

de cellules résistantes dans la population. La cassure de la courbe, qui devrait se situer à une survie d'environ 10^{-3}, vu le nombre de recombinants $\underline{Arg}^{+}_{B}$ $\underline{Str}^{r}$ obtenus, n'a jamais été observée.

La sensibilité de la souche Ra-1 aux divers types de radiations utilisés, est similaire à celle de Hfr H. Il paraît donc normal que la sensibilité d'inactivation de transfert, qui est pour Hfr H environ trois fois plus élevée que celle de la survie, soit aussi du même ordre de grandeur pour Ra-1. Or la sensibilité observée pour la transmission du marqueur le plus proche de l'origine, His est beaucoup plus élevée que ne le voudrait ce schéma.

Toute hypothèse essayant d'expliquer l'apparition du transfert induit indépendamment du transfert normal, telle que la transformation des F^{+} (1°) ou la mise en évidence de mâles préexistants (2°) ne justifie pas cette sensibilité du transfert normal, et est donc insuffisante.

Enfin un calcul approximatif du nombre de cellules transférant leur génôme en sens inverse, en fonction de la dose, (voir ci-dessous, 3°), conduit à admettre une proportion de mâles invertants d'une importance telle qu'elle se serait exprimée par des anomalies de la transmission dans la population non irradiée.

3) Hypothèse de la transformation progressive en fonction de la dose, de la séquence d'injection des mâles Ra-1.

Les radiations produisent deux types d'effet simultanément : l'inversion de la séquence de transfert, qui conduit à une augmentation proportionnelle à la dose du nombre de cellules transférant leur matériel génétique suivant la séquence anormale. Sur cette population mixte à proportions variables, les radiations agissent ensuite en inactivant le transfert

suivant un mécanisme identique à celui qui a été observé chez Hfr H (voir Chap. C). Ici, cette inactivation doit suivre deux directions, correspondant aux deux séquences de transfert en présence.

La superposition de ces deux phénomènes et l'imprécision des évaluations ne permet qu'une estimation grossière de la fréquence d'induction de cette anomalie. La comparaison des effets de l'irradiation sur Ra-1 à ceux obtenus sur une autre souche, Hfr AT IIIA, qui transfère de façon presque identique à Ra-1, mais ne présente pas le phénomène d'inversion par irradiation (Fig. D5-B) permet d'estimer entre 50 et 90 % de la population totale des mâles, la proportion de Ra-1 inversés après une dose donnant environ 10^{-3} survivants (Tab. D2). La variation de cette proportion en fonction de la dose (Fig. D6) confirme l'hypothèse d'une transformation continue de la population des mâles Ra-1 en mâles inversés.

On voit que la proportion de mâles inversés nécessaire pour expliquer les fréquences de transmission obersée est, déjà pour des doses faibles, supérieure à la quantité de F^+ présents dans une population normale de Hfr, ou à la proportion maximale de mâles inversés préexistants compatible avec l'homogénéité apparente de la population non irradiée.

Il est possible de comparer l'efficacité des radiations à produire les différents effets que nous avons observés nous avons déjà vu (Chap. C) que le nombre de lésions capables de bloquer le transfert est du même ordre de grandeur que le nombre d'événements létaux, c'est-à-dire de lésions non réparées interférant avec la survie des cellules.

A une survie de 10^{-3} , la proportion de cellules ayant inversé leur transfert est de 50 à 90 %, c'est-à-dire qu'il apparaît dans la population globale un événement d'inversion par cellule, environ. A cette survie, chaque cellule contient en

moyenne 7 à 8 événements létaux. L'inversion de transfert s'exprime donc avec une fréquence environ dix fois plus faible que la mort des cellules.

Cette différence peut être due à deux causes entre lesquelles il n'est pas possible de choisir actuellement :

a) Les lésions responsables de chacun de ces effets sont distinctes. Elles sont alors produites avec des fréquences relatives de 1 à 7 ou 8 lésions efficaces, ou ont des efficacités relatives différentes.

b) Si les lésions sont les mêmes, on est conduit à penser que le site responsable de l'inversion de transfert a une dimension dix fois inférieure à la "cible" létale, c'est-à-dire probablement au chromosome. Cette dimension est encore dix fois supérieure à celle du facteur sexuel, ce qui rend peu probable une action directe sur F.

IV - LES MODELES POSSIBLES ET LEURS IMPLICATIONS

Les fréquences de transmission observées, qui sont du même ordre de grandeur pour His et Arg_B , la séquence d'entrée des marqueurs après irradiation, toutes les propriétés de cette anomalie de transfert, sont en faveur de la transformation des cellules Ra-1 en Hfr et non en F^+. La possibilité de transformation des Ra-1 en F' paraît peu probable. En effet, il s'agirait de F' primaires, c'est-à-dire portant une délétion au niveau du site d'attachement initial du F (Scaife et Pekhov 1964). L'épisome ainsi formé n'aura plus d'affinité particulière pour ce site. Il est peu probable que la région emportée par F lui confère une affinité pour un autre site telle que la réinsertion du F' en ce site soit pratiquement totale.

Le comportement des mâles inversés stables isolés (voir ci-dessous) est aussi en contradiction avec le passage à une forme F' : l'irradiation de telles souches F' n'aurait aucune raison de faire réintégrer F à son site initial.

Cette transformation est exclusive en ce sens qu'elle induit une seule séquence d'injection, comme l'indiquent gradient et cinétique de transfert.

Le nouveau site d'attachement de F, ou au moins l'origine de transfert induite, possède certainement une propriété qui le différencie du reste du chromosome vis-à-vis de l'initiation de transfert. Cette différence peut se situer au niveau de la structure de l'ADN, de la séquence de bases, ou de la fonction de gènes situés à cet endroit.

1) Analyse de situations analogues.

Il existe des analogies entre la modification de transfert décrite ici et des exemples déjà connus de modalités de conjugaison non "classiques".

a) Richter (1961) a isolé à partir d'une population de Hfr un clone F^- chez lequel l'infection par un F étranger conduit à la formation d'une importante proportion de Hfr identiques. Cet auteur a pu montrer que le clone F^- a gardé une partie de l'ADN du facteur sexuel, et porte ainsi une région "sfa" de forte homologie avec F.

b) La présence de deux F, dont l'un au moins est autonome, dans une même cellule conduit en générale à l'exclusion de l'un d'eux, vraisemblablement par des mécanismes de type répression jouant au niveau de la réplication (Willetts et Broda 1969). Par contre il est possible d'intégrer deux facteurs sexuels, à des sites distincts dans le même chromosome (Clark 1963). Les mâles ainsi formés sont instables et transfèrent leur génôme préférentiellement suivant l'une des orientations possibles. La présence de l'autre F se traduit par une discontinuité dans la liaison des marqueurs situés de part et d'autre de ce F.

c) L'éventualité d'un transfert "anormal", c'est à-dire dans lequel F dirigerait indirectement l'initiation du transfert, a été envisagée à plusieurs reprises (voir Chap. B, V). Les modèles proposés supposent soit un transfert indépendant du F et du chromosome (Clowes et Moody 1966 ; Curtiss et Renshaw 1969 a et b), soit la formation d'Hfr instables, par attachement non covalent de F au chromosome (Curtiss et Stallions 1969) ou létaux (Curtiss et Renshaw 1969b).

2) Hypothèses proposées

Ces exemples suggèrent plusieurs hypothèses pour expliquer la modification de transfert chez Ra-1 :

a) Le modèle proposé par Jacob et all. (1963) implique qu'un F se trouve effectivement intégré, même de façon instable, au site d'ouverture du chromosome au moment de la conjugaison. Ce modèle est compatible avec l'inversion de transfer observée à condition de faire l'une des hypothèses suivantes :

α) Deux F préexistent dans la cellule. L'un d'eu réprimerait dans les conditions habituelles de croissance, le fonctionnement de l'autre. L'irradiation aurait pour effet de lever de façon plus ou moins réversible la répression sur le deuxième, ou d'inverser leurs relations de dépendance. La première possibilité rapellerait celle qui conduit à l'induction d'un prophage chez une souche lysogène. La deuxième serait du même type que celle qui provoque le fonctionnement du système de réplication du F chez un Hfr mis en présence d'une cellule réceptrice.

β) La souche $F^{+}_{1485}W$ possède deux sites "sfa", l'un dans la région de l'origine induite, l'autre dans la région de l'origine normale de Ra-1 (et peut-être de Ra-9 et Ra-11 si l'on considère que ces trois souches injectent leur génôme de façon identique). On peut imaginer que chaque type de transfert

correspond à un Hfr véritable, avec intégration du F, ce qui implique un nombre assez élevé d'événements pour passer de l'u à l'autre. On peut aussi imaginer que ces souches à l'état végétatif, sont sous forme de F^+, et n'intègrent le F, de façon covalente mais réversible, qu'au moment du croisement. Cette hypothèse nécessite l'induction, par les radiations, du déplacement et/ou de la réinsertion du F dans le chromosome.

Ces deux possibilités rendent compte de la spécificité, sinon de la fréquence de la modification induite.

b) Des mécanismes de transfert "anormaux" ne répondant pas au schéma de Jacob et all. (1963) peuvent être envisagés :

α) Un contrôle à distance, par F, de l'initiation du transfert, ou de la réplication spécifique, sans déplacement du F s'il est intégré, ou sans intégration si il est autonome.

β) Une perte, partielle ou totale, du contrôle de F sur le transfert. Celui-ci serait dirigé par des fonctions équivalentes du chromosome, et/ou utiliserait de nouvelles structures produites par l'irradiation.

Ce type de mécanisme pourrait être induit avec une fréquence élevée, mais répond plus difficilement à la nécessité d'une spécificité de la modification produite.

3) Les implications de ces hypothèses. Discussion

Un certain nombre de résultats acquis permettent de discuter ou de compléter les hypothèses proposées. En outre certaines de leurs implications sont différentes et pourront être testées.

Plusieurs arguments peuvent être avancés contre l'hypothèse de la présence de deux sites préférentiels d'injection dans les cellules Ra :

a) Aucun Hfr correspondant à la séquence de transfert induite n'a été isolé au cours de la sélection des Hfr Ra, et aucun transfert inverse n'est mis en évidence spontanément chez Ra-1. En outre, au cours de l'isolement de Ra-1, des Hfr possédant des séquences de transfert différentes de Ra-1 et de la séquence induite ont été isolés avec une fréquence élevée (3/12).

b) Aucune discontinuité dans la liaison des marqueurs, dans la région Ilv - $\underline{Arg}_B$ n'a été mise en évidence, comme celà a été observé par Clark (1963) dans le cas d'un double mâle.

c) Les radiations quel que soit leur type induisent le fonctionnement du cycle végétatif d'un prophage. Elles pourraient d'une façon analogue induire le fonctionnement d'un F normalement réprimé. Mais on voit mal comment elles pourraient en même temps réprimer le fonctionnement d'un autre F actif dans la suspension non irradiée.

d) L'analyse du type sexuel des clones formés après irradiation de Ra-1 à une dose donnant une survie de 10^{-3}, et 50 à 90 % d'inversion a été effectuée (tab. D3). La capacité à transférer de façon inverse n'est conservée que par une très faible proportion des descendants de la population irradiée. Des résultats semblables ont été obtenus par Low (1965) : 4 % seulement des survivants transfèrent de façon stable suivant la séquence "inverse", après une irradiation UV donnant 1 % de survie.

Le fait que quelques Hfr inversés stables aient été isolés indique que la modification n'est pas nécessairement létale.

Cette instabilité de l'inversion est difficilement compatible avec l'hypothèse de l'induction d'un deuxième F intégré dans le chromosome de Ra-1.

Par contre un certain nombre d'autres résultats sont plutôt en faveur d'un modèle du type "double sfa" :

a) L'irradiation à une faible dose d'UV du F^+W 148 ou d'un F^+ issu de Ra-1, met en évidence deux séquences de transfert préférentielles, qui correspondent à celles de Ra-1 avant et après irradiation (Low 1965).

b) Low (1965) a d'autre part confirmé qu'il s'agit bien d'une propriété du chromosome et non du facteur sexuel de W 1485 et des souches qui en sont dérivées. Les cellules F^+ sont transformées en F^- par traitement à l'acridine orange, puis infectées par un facteur sexuel étranger au groupe Ra. Le comportement des nouveaux clones F^+ ainsi isolés est le même vis à vis des radiations que celui de W 1485. Par contre, le transfert du F de W 1485 ou de clones F^+ spontanés issus de Ra-1 à des souches F^- ne provoque pas chez ces dernières l'apparition du caractère anormal.

c) L'étude des clones stables inversés isolés parmi les survivants de Ra-1 (tab. D3 et Low 1965) indique que la région de l'origine de Ra-1 a elle aussi des propriétés particulières. Ces clones, par irradiation, sont induits à transférer suivant la séquence de Ra-1. Le processus semble symétrique du premier événement d'inversion.

d) L'existence de souches dérivées de W 1485 portant des transpositions diverses de la région Pro-Lac (Berg et Curtiss 1967) pourrait être un argument en faveur de l'hypothèse d'un déplacement de F au moment de l'induction de l'inversion de transfert. Ces auteurs ont obtenu des souches portant des transpositions, par irradiation UV de F^+ W 1485. Il serait donc possible que cette souche ait une tendance à transposer

certaines régions de son génôme. On peut remarquer cependant qu'aucune transposition de l'une ou l'autre des deux régions qui intéressent le système Ra-1 n'a été observée. En outre, parmi les Hfr et F' qu'ils ont obtenus par suite de cette irradiation, aucun ne semble assimilable ni à Ra-1 ni aux Hfr inversés.

Les faits suivants peuvent être avancés en faveur de l'hypothèse de l'induction d'un mode de transfert "anormal":

a) La proportion de F^+ trouvée parmi les survivants (tab. D3) est incompatible avec la fréquence de conjugaison globale de la population, si l'on considère que seuls les Hfr transfèrent le chromosome. Une proportion de F^+ du même ordre de grandeur a été observée dans la population-témoin. Mais il est difficile de savoir si ce résultat est significatif car l'analyse a été effectuée sur un nombre très faible de cellules. Ces deux observations sont à rapprocher de la mise en évidence par Curtiss (1969) de souches F^+ incapables de former des Hfr stables ou viables, mais transfèrant le chromosome à une fréquence normale.

b) La haute fréquence d'induction de l'inversion et sa disparition après division des survivants suggèrent que la séquence de transfert induite pourrait correspondre à une séquence de synthèse d'ADN. La spécificité de l'inversion est difficilement compatible avec l'idée que le transfert induit utiliserait une chaîne d'ADN synthétisée à la suite de phénomènes de réparation.

Par contre des études de la localisation de l'origine de réplication végétative de diverses souches de Coli, et en particulier d'un F^+ W 1485 et de souches dérivées (Caro et Berg 1968, 1969 ; Wolf et all. 1969) indiquent comme site d'initiation de la réplication la région Lys_A - Xyl. Il n'est

donc pas exclu que l'une des origines de transfert mises en évidence chez Ra-1 avec et sans irradiation ne corresponde à l'origine de réplication végétative. Les radiations perturberaient le fonctionnement normal de F et conduiraient à utiliser la séquence de réplication végétative comme séquence de transfert. Ce modèle ne présume en rien de la localisation de F dans la cellule.

4) Conclusions

Aucune hypothèse n'a pu être proposée qui soit compatible avec toutes les caractéristiques de l'inversion de transfert mises en évidence chez le groupe des souches Ra. La présence de deux sites "sfa", ou de deux sites préférentiels d'injection préexistants dans la souche W 1485 est assez satisfaisante, mais insuffisante.

La possibilité d'une modification des interactions normales entre les systèmes de réplication du F et du chromosome peut expliquer une partie des résultats. Il est intéressant de rapprocher cette hypothèse de la mise en évidence par Caro(197 d'une possibilité de complémentation ou de sauvetage du réplicon chromosomique par un F intégré. Le phénomène décrit ici ressortirait du processus inverse.

Il est apparu que le mode de transfert de la souche Ra-1 elle-même est peut-être différent de celui qui est généralement admis (Jacob et all. 1963).

Une étude plus fine de la durée de vie de la capacité à transférer suivant la séquence inverse, de sa transmission éventuelle aux recombinants, et des synthèses impliquées dans son induction ou son maintien est nécessaire. Cette étude a été entreprise sur une autre souche, Hfr B-11, pour plusieurs raisons : les origines de transfert normale et induite de B-11 se trouvent dans une région riche en marqueurs, donc permettant

une analyse plus fine. La souche B-11 est aussi plus stable que Ra-1. En fait il est possible que certains aspects de l'inversion, en particulier la recherche d'un éventuel déplacement de F, auraient été plus faciles à étudier chez Ra-1.

Nous envisageons de reprendre l'étude de cette souche.

ooo ooo

ooo

FIGURE D 1

CINETIQUE D'INJECTION DE Ra-1 AVEC ET SANS IRRADIATION

Des cultures en phase exponentielle de croissance en milieu complet de Ra-1 et de F^- PA 309 sont mélangées dans les proportions de 10^7 mâles pour 10^8 F^-/ml , et placées à 37°. Des échantillons sont prélevés toutes les minutes, et agités violemment sur un Vortex. Les recombinants suivants sont alors titrés, par étalement sur des milieux synthétiques appropriés :

$\underline{His}^+ \underline{Str}^r$, $\underline{Trp}^+ \underline{Str}^r$, $\underline{Thr}^+ \underline{Str}^r$, $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r$

et incubation de 48h à 37°C.

Les valeurs obtenues sont données en fréquence par rapport au nombre de mâles présents dans la suspension au début du croisement.

Ordre d'injection de Ra-1 :

O , $\underline{His}$, $\underline{Trp}$, $\underline{Leu}$, $\underline{Thr}$, $\underline{Arg}_B$, $\underline{Str}^s$.

A - Hfr Ra-1 non irradié.

B - Ra-1 préalablement irradié aux rayons X (dose 3800r, survie 5.10^{-3}).

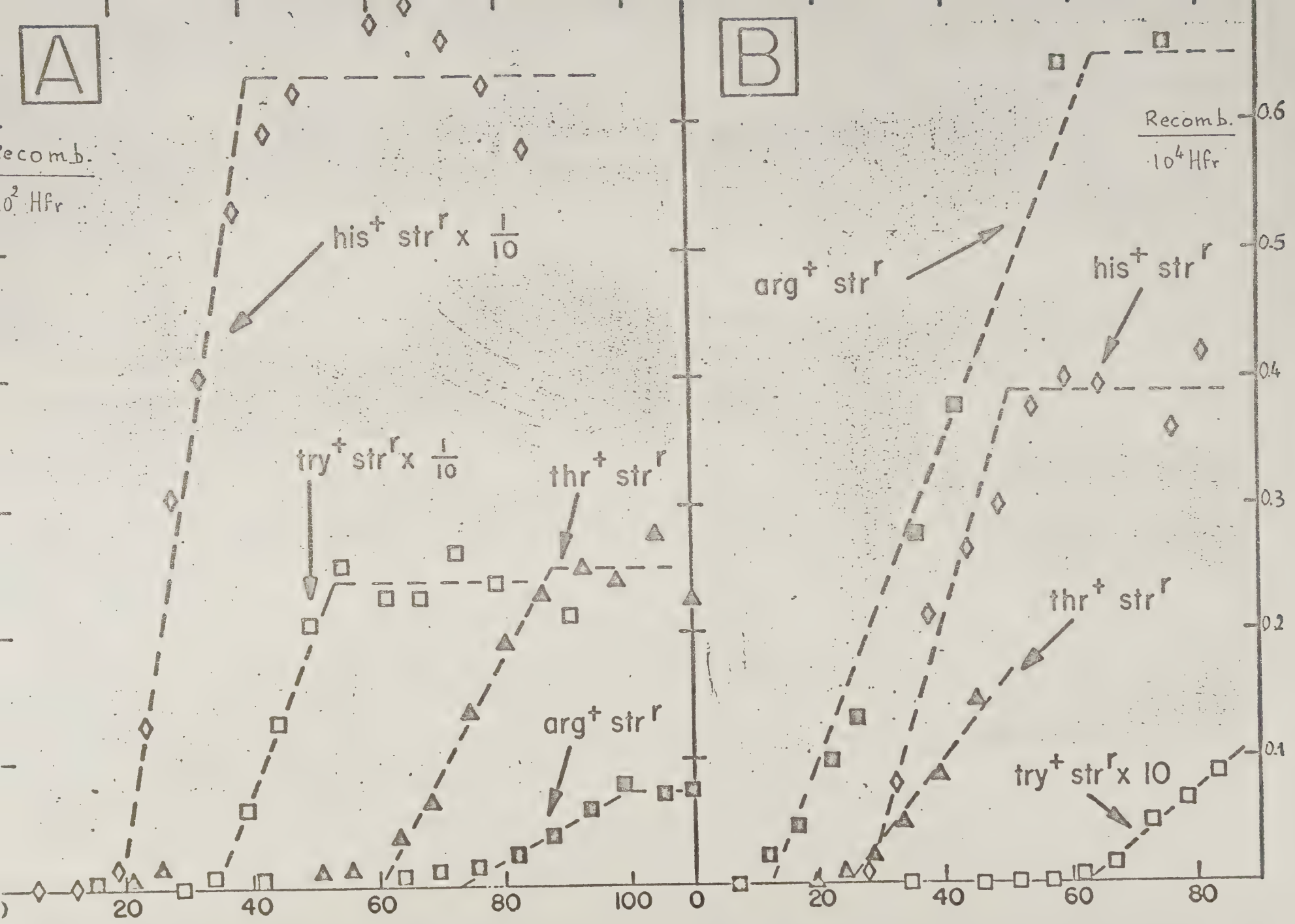

A
B
Recomb.
10² Hfr
Recomb.
10⁴ Hfr
his⁺ str^r x 1/10
try⁺ str^r x 1/10
thr⁺ str^r
arg⁺ str^r
arg⁺ str^r
his⁺ str^r
thr⁺ str^r
try⁺ str^r x 10
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
20
40
60
80
100
0
20
40
60
80
MINUTES OF MATING BEFORE BLENDING

Fig D1

FIGURE D 2

IRRADIATION DE Ra-1 AVANT LE CROISEMENT

Une culture à 2.10^8 cell/ml de Ra-1 est irradiée aux rayons X à 0°C , par doses cumulatives, et croisée immédiatement à 37°C avec une culture de la souche réceptrice PA 309, à raison de 1 Hfr pour 10 F^- . Le croisement dure 90 min. La survie des mâles est mesurée immédiatement après irradiation. Les recombinants sont titrés comme dans la figure D1.

A - Courbes de "survie" des marqueurs. Chaque courbe représente l'inactivation de transmission du marqueur étudié, c'est-à-dire le rapport du nombre de recombinants obtenus à chaque dose au nombre obtenu sans irradiation. La courbe de survie des mâles est indiquée.

B - Variation du gradient de transmission en fonction de la dose. Les fréquences de transmission (nombre de recombinants/nombre de mâles totaux) sont données en fonction de la séquence d'entrée normale des marqueuts chez Ra-1 non irradié.

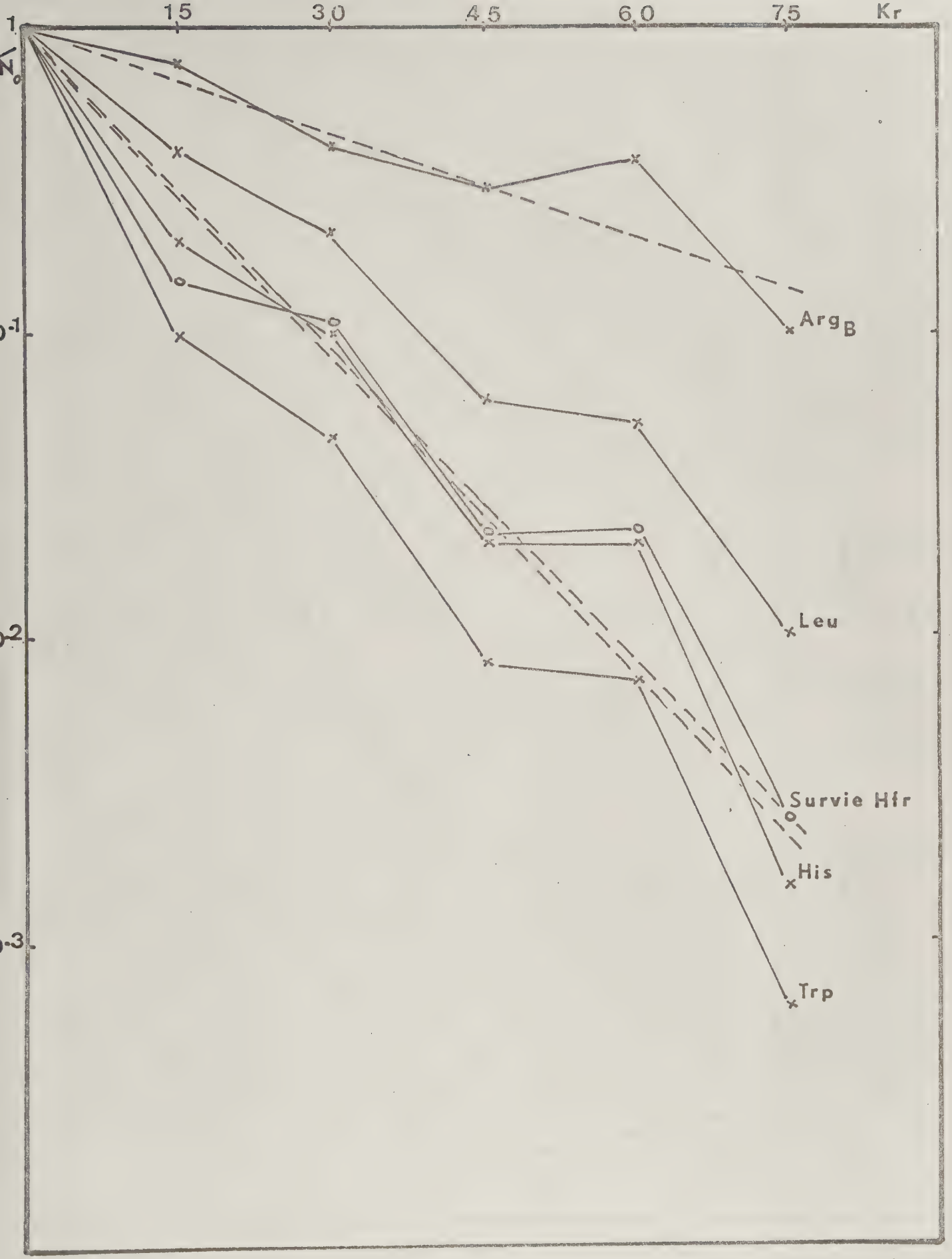


Fig D2-A

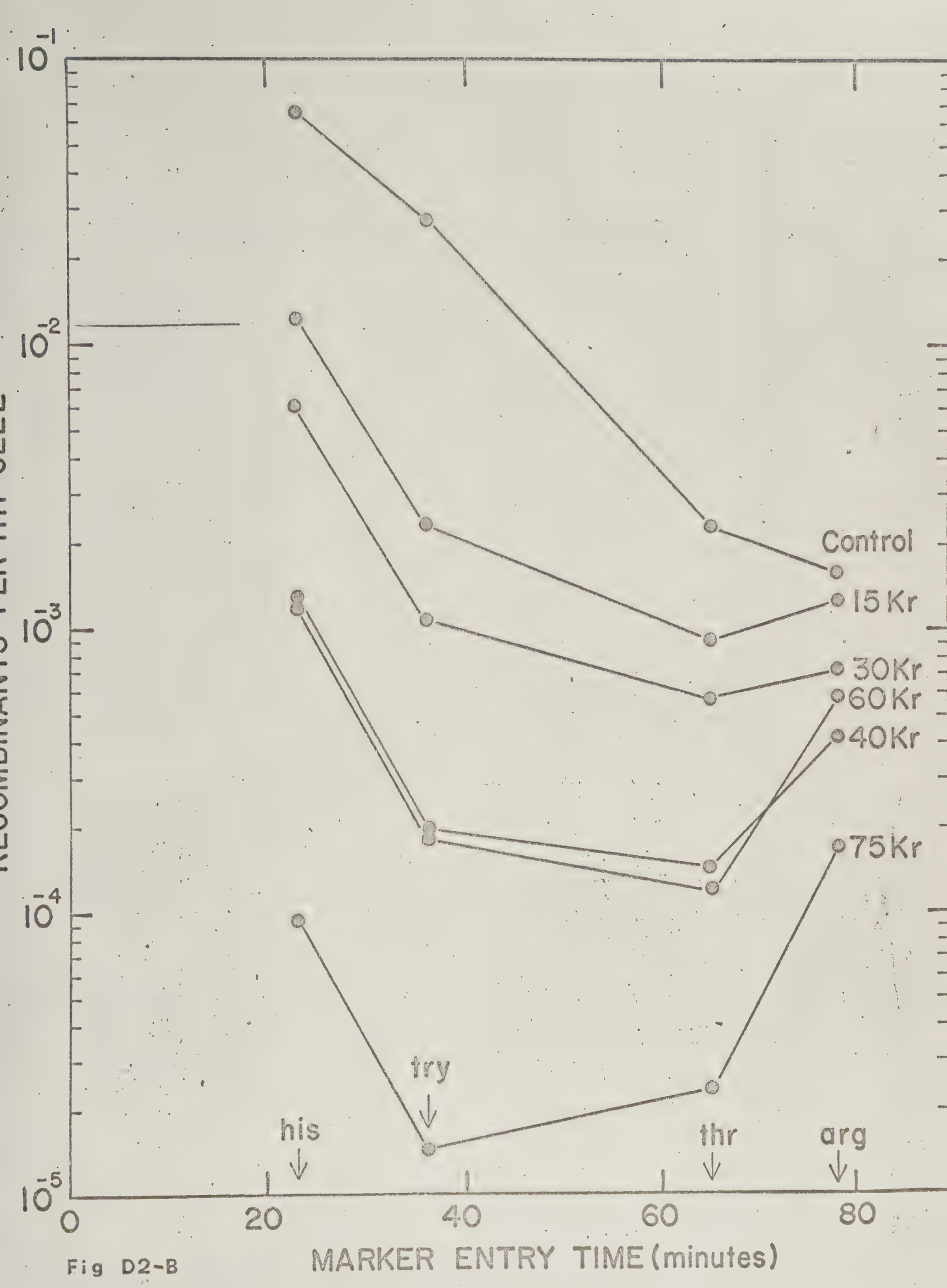

RECOMBINANTS PER INPUT CELL
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
Control
15 Kr
30 Kr
60 Kr
40 Kr
75 Kr
try
his
thr
arg
0
20
40
60
80
MARKER ENTRY TIME (minutes)

Fig D2-B

FIGURE D 3

ANALYSE DE LA TRANSMISSION DES CARACTERES NON SELECTIONNES

Une culture en phase exponentielle de croissance de Hfr Ra-1 en milieu complet est filtrée, et suspendue en milieu synthétique. Elle est irradiée aux UV, par doses cumulatives. A chaque dose, un échantillon est prélevé pour titrer la survie et pour effectuer un croisement avec la souche PA 309, dans les conditions décrites pour l'expérience de la figure D2.

Les résultats obtenus par numération des recombinant sélectionnés sont similaires à ceux obtenus après irradiation X (Fig. D2). A chaque dose et pour chaque type de recombinant 100 à 200 colonies sont repiquées sur le milieu sélectif approprié et répliquées sur les autres milieux de sélection. Le résultats sont donnés en pourcentages de contransmission d'un marqueur non sélectionné et du caractère de sélection, en fonction de la dose.

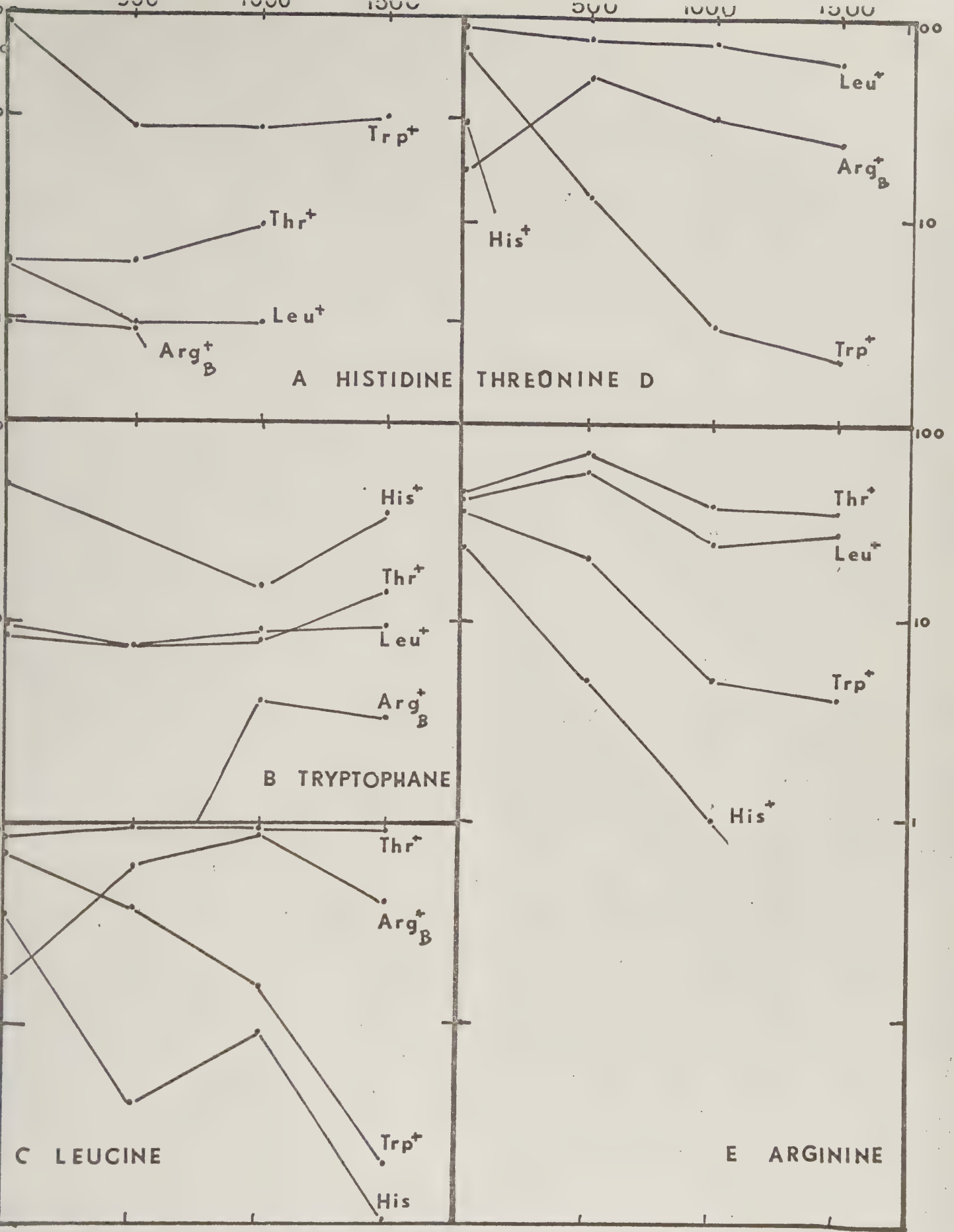

500
1000
1500
Trp+
Thr+
Leu+
Arg+B
A HISTIDINE
His+
Leu+
Arg+B
Trp+
THREONINE D
100
10
His+
Thr+
Leu+
Arg+B
B TRYPTOPHANE
Thr+
Leu+
Trp+
His+
100
10
1
Thr+
Arg+B
Trp+
His
C LEUCINE
E ARGININE

Fig D3

FIGURE D 4

MODIFICATION DE LA SEQUENCE DE TRANSMISSION DE Ra-11 PAR IRRADIATION X

La croissance, l'irradiation et les croisements sont effectués selon la même procédure que dans la figure D2.

Ordre d'injection de Ra-11 : $\underline{Pur}_G$, Trp , Pro , Thr , Arg , Ilv , $\underline{Str}^s$.

Souche réceptrice : PA 3344.

A - Diminution de la transmission des marqueurs, en fonction de la dose. Les résultats sont donnés en valeurs absolues de recombinants. La diminution du nombre de mâles survivants est indiquée, aussi en valeurs absolues.

B - Variation du gradient de transmission. Les fréquences de transmission (nombre de recombinants/ nombre total de mâles) sont représentées en fonction de la séquence normale de transfert de Ra-11, pour chaque dose.

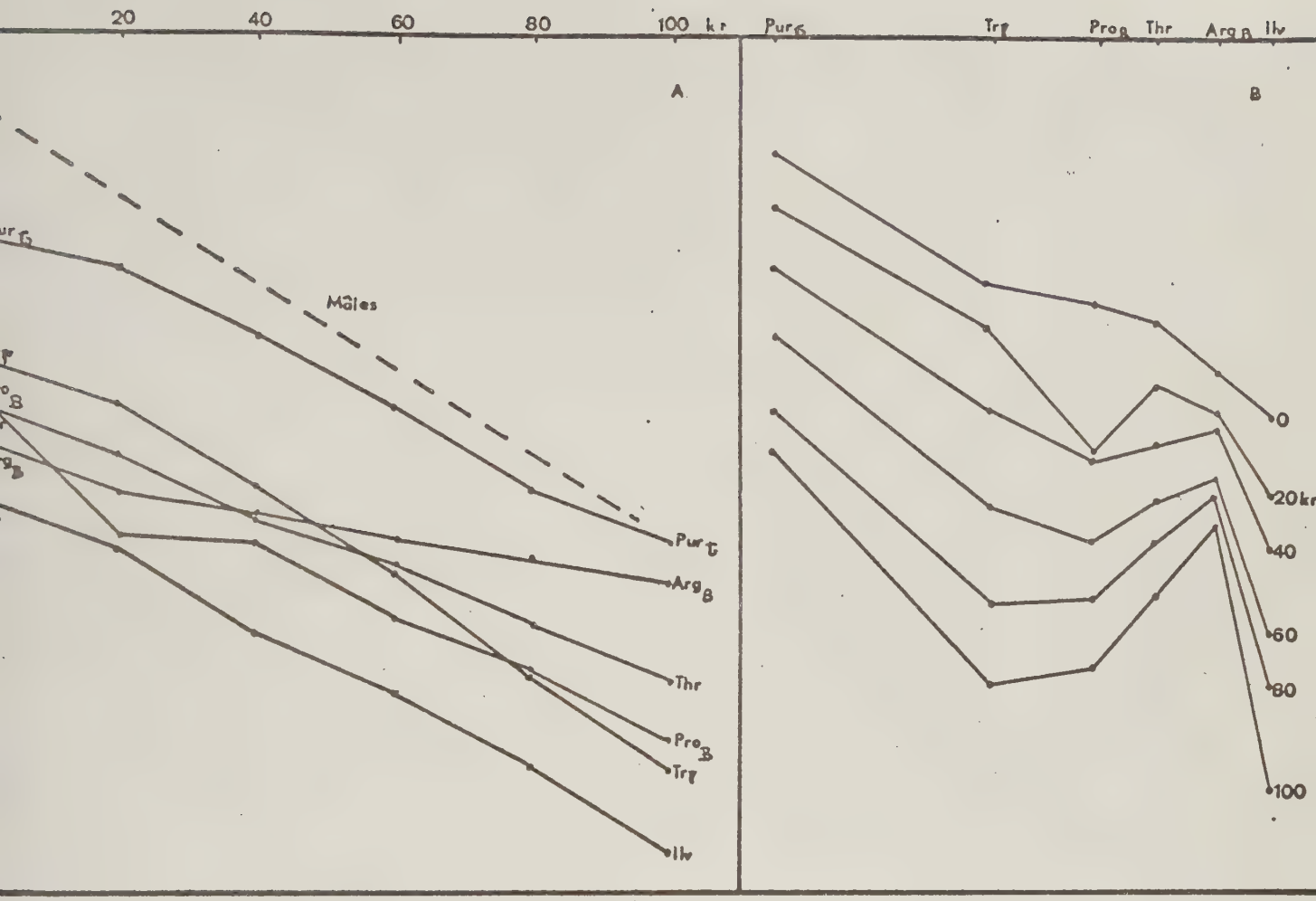

20
40
60
80
100 kr
A
Mâles
Pur T
Arg B
Thr
Pro B
Trp
Ilv
Pur G
Trp
Pro B
Thr
Arg B
Ilv
B
0
20kr
40
60
80
100

Fig D4

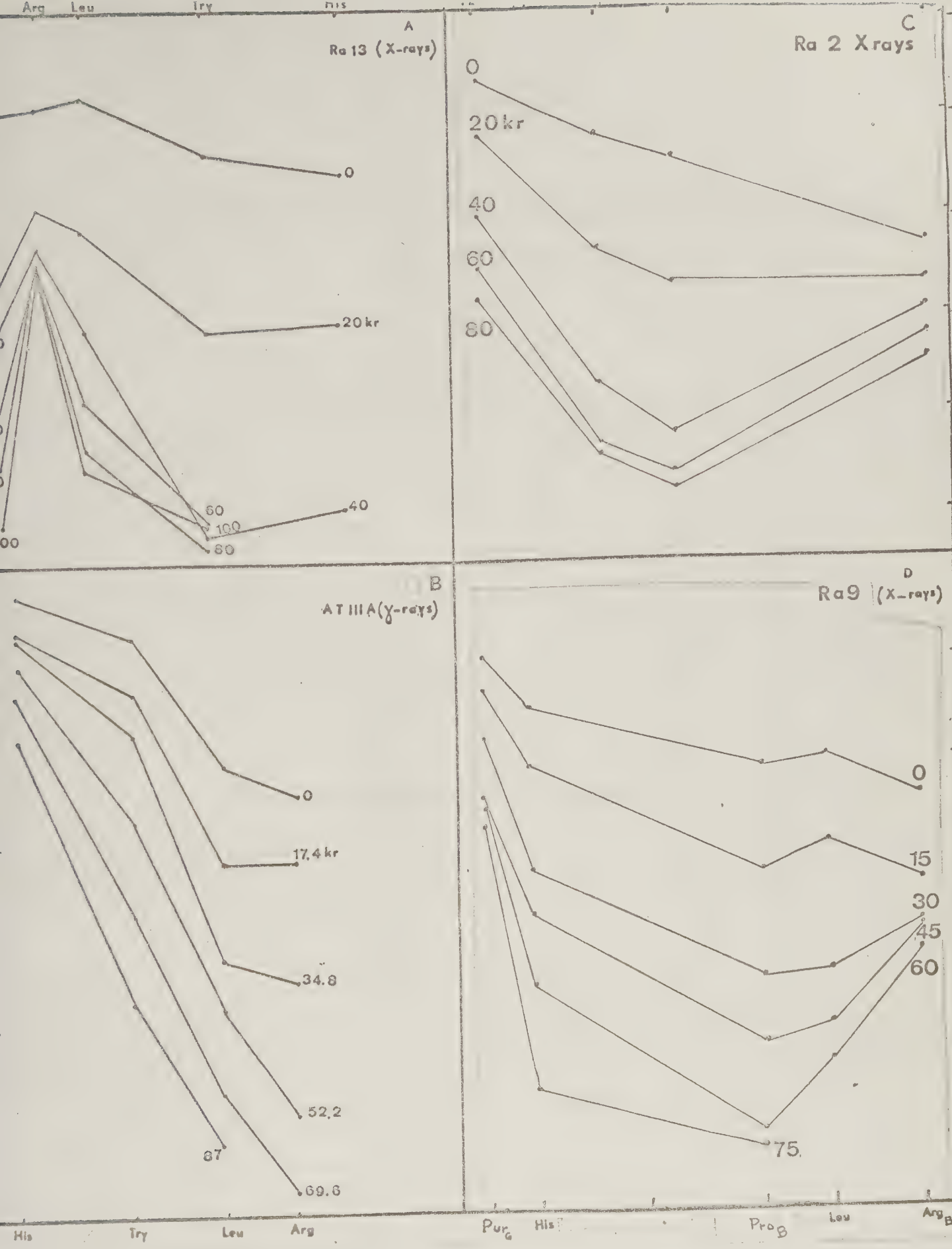
FIGURE D 5

MODIFICATION DE GRADIENT DE TRANSMISSION PAR IRRADIATION

Hfr Ra-13 , Ra-9 , Ra-2 , et AT IIIA

Des cultures en phase exponentielle de croissance de ces mâles sont irradiées et croisées dans les conditions décrites précédemment (Fig. D2). Les doses utilisées font descendre la survie des mâles à 10^{-3} ou 10^{-4} pour la dose maximale indiquée. Les souches réceptrices utilisées sont indiquées dans l'appendice.

Les résultats sont présentés sous la forme de la variation de la fréquence de transmission de chaque recombinant (Recombinants/mâles totaux), à chaque dose, en fonction de la séquence de transfert normale du mâle.


A
Ra 13 (X-rays)
0
20kr
40
60
100
80
B
AT III A (γ-rays)
0
17.4kr
34.8
52.2
87
69.6
His
Try
Leu
Arg
C
Ra 2 Xrays
0
20kr
40
60
80
D
Ra9 (X-rays)
0
15
30
45
60
75
Pur G
His
Pro B
Leu
Arg B

ig D5

FIGURE D 6

VARIATION DE LA QUANTITE DE CELLULES TRANSFERANT SUIVANT LA SEQUENCE INDUITE CHEZ Ra-1

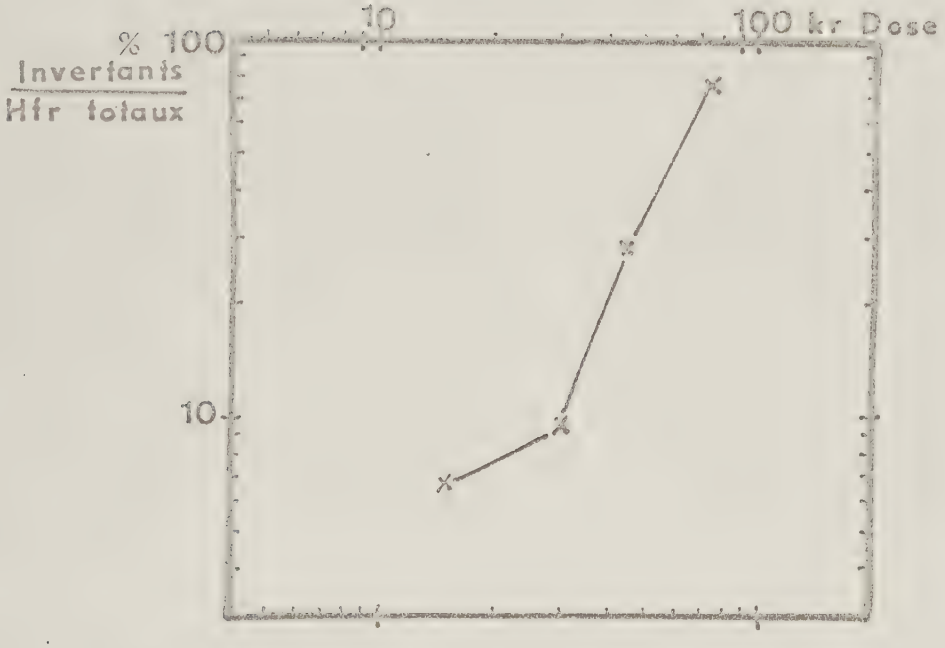


Fig D.6

Cette courbe représente les valeurs obtenues dans le tableau D2, dernière ligne, tirées de l'expérience de la figure D2.

TABLEAU D1

EFFETS DE L'IRRADIATION DES MALES SUR LEUR SEQUENCE DE TRANSMISSION

Chaque ligne représente plusieurs expériences effectuées sur le mâle indiqué. Les conditions expérimentales sont similaires à celles décrites dans la figure D2. Les souches femelles utilisées dans chaque cas sont indiquées dans l'appendice. Les chiffres représentent le rapport

$$\frac{\text{Recomb. } A^{+}X^{r} \text{ après irradiation du mâle, survie } 10^{-3}}{\text{Recomb. } A^{+}\ X^{r} \text{ sans irradiation du mâle}}$$

c'est-à-dire la "survie" de la transmission des marqueurs.

La flèche indique la séquence de transfert normale, la lettre F symbolisant l'emplacement du facteur sexuel. Les origines et directions de transfert induites sont indiquées, le cas échéant, par une double flèche.

La dernière colonne du tableau indique les types de radiations qui ont été utilisés, toujours avec des résultats semblables, pour chaque souche.

TABLEAU D 1

Hfr	Thr	Leu	Pro_B	Trp	His	Pur_G	Ilv	Arg_B	Radiat
H	← 8×10^{-2}	7×10^{-2}		1×10^{-2}	1×10^{-3}			4×10^{-4} F	RX, α, UV, 32
ATIIIA		7×10^{-4}		2×10^{-3}	2×10^{-1} → F			1×10^{-4}	RX, γ,
Ra 1	$1,5\times10^{-3}$	7×10^{-4}		2×10^{-4}	5×10^{-4}	→ F		⇇ 1×10^{-2}	X, α, 32P, γ
Ra-2	← 5×10^{-3}	$2,5\times10^{-3}$		$3,5\times10^{-4}$	5×10^{-4}			⇇ 7×10^{-2} F	X
Ra-9		1×10^{-4}	5×10^{-5}		$1,5\times10^{-4}$	2×10^{-2} → F		⇇ 3×10^{-3}	X
Ra-11	1×10^{-2}		2×10^{-3}	1×10^{-3}		7×10^{-3} → F	$2,5\times10^{-3}$	⇇ 8×10^{-2}	X
Ra-13		4×10^{-3}		2×10^{-4}	5×10^{-3}	F ←	1×10^{-2}	⇇ 4×10^{-2}	X, α.

TABLEAU D2

CALCUL DE L'EFFICACITE D'APPARITION DE L'INVERSION DE TRANSFERT

Ce calcul est basé sur le raisonnement suivant : les valeurs obtenues (Fig. D2-A) après irradiation de Ra-1 sont pour chaque dose la somme de l'inactivation de transfert d'une population mixte au point de vue de la séquence de transfert. On fait l'hypothèse que, pour chaque composant de ces populations, l'inactivation suit la même loi, considérée comme similaire à celle observée par irradiation de Hfr H (Chap.C) ou de AT IIIA. (Fig. D5-B). La souche AT IIIA se comporte comme une population homogène vis à vis de l'irradiation, et a une séquence de transfert à peu près identique à celle de Ra-1. La mesure de l'inactivation de transfert de AT IIIA pourra être utilisée pour représenter l'inactivation de transfert des cellules de Ra-1 qui ont gardé leur séquence d'injection normale, à chaque dose. Cette mesure est faite sous forme de calcul du rapport des quantités de recombinants $\underline{His}^+ \underline{Str}^r$ et $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r$: His est transféré tôt par les deux mâles, donc très peu touché par l'irradiation ; la quantité de recombinants $\underline{His}^+ \underline{Str}^r$ peut être utilisée comme une mesure du nombre de cellules transférant suivant cette séquence.

A chaque dose le rapport $\frac{\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r}{\underline{His}^+ \underline{Str}^r}$ représente l'inactivation de transfert de la longueur de chromosome correspondante (ligne 6 pour AT IIIA et ligne 7 pour Ra-1). Les recombinants $\underline{His}^+ \underline{Str}^r$ obtenus après irradiation de Ra-1 sont considérés comme tous dûs au transfert "normal". On calcule alors la quantité de recombinants $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r$ résultant de ce transfert (ligne 8). Il est alors facile, par soustraction, de connaître les quantités de recombinants $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r$ issus de Ra-1 dûs à un autre type de transfert (ligne 9). $\underline{Arg}_B$ étant alors très proche de l'origine de transfert induite, la quantité de recombinants $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}$ en excès est représentative de la quantité de cellules transférant suivant cette séquence. La proportion de Hfr de ce type présents dans la suspension à chaque dose représente le rapport

$$\frac{\text{Hfr normaux (ligne 9)}}{\text{Hfr totaux (normaux + anormaux, lignes 1 + 9)}}$$

TABLEAU D 3

TYPES SEXUELS DES CLONES DE Ra-1 SURVIVANTS

Une suspension de Ra-1 est irradiée et croisée suivant le processus décrit dans la figure D2. L'irradiation par les raysons α est faite, à partir d'une source de ^{232}Po, sur une couche monocellulaire de bactéries, recueillies sur un filtre millipore. L'irradiation est faite à température ambiante, par doses non cumulatives. La durée maximum d'irradiation est de quelques minutes.

Des colonies de mâles survivants sont reprises, en milieu liquide, amenées en phase exponentielle de croissance, et croisées suivant le processus habituel, avec une souche réceptrice*. Les fréquences de transmission obtenues indiquent s'il s'agit de clones F^+ (fréquence de transmission de 10^{-3} et 10^{-4} pour tous les marqueurs testés), Hfr Ra-1 (gradient de transfert identique à celui de la figure D1), ou Hfr inversé (gradient décroissant de $\underline{Arg}_B$ vers Thr et His.

---

* Il s'es produit environ 30 divisions entre la cellule irradiée et la suspension croisée.

TABLEAU D 3

Types de radiations	Survie	Nombre de survivants testés	Nombre de Hfr Ra-1	Nombre de F^+	Nombre de Hfr inversés
X	10^{-3}	19	5	14	0
α	10^{-3}	20	1	19	0
α	10^{-3}	20	3	16	1
Total		59	9	49	1
%		100	15	84	$\leqslant 2$

C H A P I T R E E

INDUCTION A HAUTE FREQUENCE D'UNE ANOMALIE DE TRANSFERT CHEZ LA SOUCHE MALE Hfr B-11

La conduite de ce travail menant à la mise en évidence de l'induction d'une inversion de transfert chez B-11 a été similaire à celle qui a été décrite pour Hfr Ra-1. La différence de comportement qui a ensuite semblé apparaître nous a conduits à compléter cette étude par l'analyse plus précise de certains aspects génétiques et métaboliques de l'inversion. En particulier, une interférence éventuelle de la réplication végétative de l'ADN a été envisagée.

I - CARACTERISATION DE L'ANOMALIE DE TRANSFERT INDUITE CHEZ B-11

1) La séquence normale de transfert des marqueurs de B-11, définie par Broda (1967) est la suivante : O, $T6^s$, Pur_E, Trp , Thr , Lac. L'origine est donc localisée de façon très précise, entre $T6^s$ et Lac (voir la carte du chromosome de Coli , appendice).

Les gradients de fréquence de transfert obtenus au cours de nos expériences (Fig. E1) sont en accord avec ces données. On peut toutefois noter qu'une fréquence relativement trop élevée (pouvant aller jusqu'à dix fois trop) a souvent été obtenue, pour certains marqueurs distaux : Leu , Pro_B . Cet excès a été constamment observé pour le marqueur Pro_B. Ce marqueur n'étant porté que par l'une des souches F^- dont nous disposions, nous ne pouvons dire s'il s'agit d'un effet propre à la mutation portée par la femelle, ou d'une caractéristique du transfert par B-11. La signification de cette anomalie n'est pas connue, et n'a pas été étudiée. On verra plus loin qu'en

tous cas il ne peut s'agir d'un transfert dû à une minorité de Hfr stables injectant leur chromosome d'une façon différente de B-11.

2) Modification de la séquence de transfert

Les figures E2-A et E7 montrent les courbes d'inactivation de transfert obtenues après irradiation de B-11 et croisement avec deux femelles différentes.

Les marqueurs utilisés sont répartis sur l'ensemble du chromosome, certains sont très proches de l'origine (Pro_C , Pur_E) ou de la queue (Pro_B). Les sensibilités d'inactivation du transfert des différents gènes varient de façon conforme à leur ordre sur le chromosome. Mais cette variation semble correspondre à une direction de transfert inverse de celle de B-11 Tout se passe comme si Pro_B et Leu étaient transférés précocement, et que Trp et Pur_E se trouvaient à la fin du chromosome. Les marqueurs utilisés permettraient, dans cette hypothèse, de placer l'origine entre Pro_B et Pur_E , c'est-à-dire dans une région longue de 6 à 8 minutes, dans laquelle se trouve l'origine d'injection normale de B-11.

L'analyse de la constitution génétique des recombinants sélectionnés (Fig. E3) est compatible avec cette conclusion : il est très net en particulier que Trp , His et Arg_B ont le comportement de marqueurs distaux par rapport à Thr et Leu (voir à titre de comparaison la même étude effectuée sur Hfr H, Fig. C5).

3) Conclusions

La séquence de transfert induite serait inverse de celle de B-11, les marqueurs utilisés permettant seulement de supposer que la nouvelle origine se trouve dans la région Pro_B - Pur_E (6 à 8 minutes du chromosome).

Le comportement de B-11 après irradiation, d'après ces résultats semble qualitativement comparable à celui de Ra-1. Une différence importante apparaît : la séquence de transfert induite n'est pas la même que celle des mâles du groupe Ra. Ce qui amène les questions suivantes :

a) L'inversion de transfert, et en particulier la localisation de l'origine induite résultent-elles de processus identiques dans les deux cas ? Dans l'affirmative, ce serait le matériel génétique de ces deux souches qui différerait, par exemple par transposition des régions impliquées dans le mécanisme de l'inversion.

b) Si le phénomène est le même que chez les mâles Ra, tous les mâles Hfr issus de F^+ W 1655 doivent conduire par irradiation à l'apparition d'une séquence de transfert identique à celle mise en évidence après irradiation de B-11.

c) Les caractéristiques de cette induction sont-elles semblables à celles de l'inversion de Ra-1 : grande fréquence, instabilité. Une réponse affirmative serait en faveur de l'hypothèse d'un mécanisme identique dans les deux cas.

II - ETUDE DE QUELQUES SOUCHES ISOGENES DE B-11

Nous possédons deux mâles issus du même F^+ que B-11, les souches B-1 et B-9? La séquence de transfert induite par les radiations chez B-11, telle qu'elle a pu être définie plus haut, semble au moins très proche de celle de B-1 (O, $\underline{Pro}_B$, Leu, ... Lac). Ces deux souches rappellent le couple Hfr Ra-1-Hfr inversés. La souche B-1 serait-elle un clone stable identique aux mâles induits par irradiation de B-11 ? Dans ce cas, B-1 devrait, par irradiation, être amené à transférer comme B-11, ou au moins ne pas voir son sens d'injection modifié.Par contre B-9 devrait être induit à transférer comme l'une ou l'autre de ces deux souches. Les résultats obtenus semblent indiquer que ni B-1 ni B-9 ne sont induits à modifier leur séquence de transfert par irradiation (Fig. E4) (Espardellier-

Joset et Fournier 1966). On peut alors se demander si la modification mise en évidence chez B-11 relève du même type de mécanisme que celle conduisant à l'inversion chez les mâles du groupe Ra. Alors que le site de l'origine induite chez ces derniers était une propriété chromosomique (Low 1965), existant déjà chez le F^+, il apparaît ici qu'il s'agit d'un caractère propre à B-11. Ce mâle est un mutant spontané de F^+ W 1655. Il est donc peu probable qu'il ait acquis une deuxième mutation responsable de l'inversion du sens de transfert, indépendante de la première, c'est-à-dire de l'attachement de F dans le chromosome.

III - ESTIMATION DE L'EFFICACITE D'INDUCTION

Le calcul de l'efficacité de transformation de B-11 n'a pu être effectué par comparaison directe avec une autre souche mâle présentant à peu près la même séquence de transfert, car nous ne possédions pas de telles souches. Il a donc fallu reconstruire les courbes théoriques d'inactivation du transfert de certains marqueurs dans l'hypothèse d'un effet des radiations identique à celui obtenu chez Hfr H. Les valeurs théoriques des pentes d'inactivation ont été rapportées aux quantités réelles de recombinants obtenus, dans la représentation de la variation du gradient en fonction de la dose (Fig. E5 et tab. E1). Les extrapolations à l'axe des ordonnées des droites ainsi obtenues sont proportionnelles au nombre de mâles ayant effectivement transféré leur chromosome suivant l'orientation envisagée (voir Chap. C, § III et Fig. C4-A et C4-C), et permettent d'en obtenir une estimation.

Ce calcul a été fait pour évaluer l'efficacité de disparition du transfert suivant la direction B-11, et l'efficacité d'apparition du transfert suivant la direction opposée, dans l'hypothèse d'un retournement de l'orientation de F, sans

déplacement. Ces calculs décrits dans le tableau E1, sont assez complexes et très imprécis, ne serait-ce que dans la détermination graphique des pentes des courbes et des extrapolations. Ils ne sont qu'une approximation, basée sur l'hypothèse d'une simple inversion du F. Ils conduiraient évidemment à des valeurs différentes s'il fallait considérer que F a été déplacé. Ils donnent cependant un ordre de grandeur du phénomène.

La disparition progressive des mâles B-11 est à peu près compensée (Fig. E6) par l'apparition des cellules transférant en sens inverse. Les deux courbes semblent varier de façon continue en fonction de la dose. Le maximum de transformation obtenu dans l'expérience présentée dans la figure E6 est proche de 100 %. La fréquence d'induction est donc du même ordre de grandeur que dans le cas des souches Ra.

Ce résultat appuie la même hypothèse que dans le cas précédent : la transformation progressive des mâles B-11 en un autre type de mâles. Pour les mêmes raisons que précédemment (Chap. D, § III), les autres possibilités : sélection de mâles préexistants ou induction à produire un transfert chromosomique des F^+ présents dans la population, sont incompatibles avec les fréquences d'induction observées.

IV - RECHERCHE D'UNE MODIFICATION CHROMOSOMIQUE CHEZ B-11IRRADIE

Dans le cas des mâles Ra, nous avons été conduits à supposer l'existence dans la région de l'origine induite, d'une structure ou d'une fonction qui la différenciait du reste du chromosome, du moins quant à son rapport possible avec le facteur sexuel ou un produit du F. Dans le cas de B-11, la possibilité d'un simple retournement de F sans déplacement n'est pas exclue. Nous avons donc cherché à définir l'origine de façon plus précise, et en même temps à repérer le facteur sexuel chez les cellules irradiées.

1) Etude des survivants à l'irradiation

La méthode la plus simple pour déterminer la localisation de l'origine de transfert induite consiste à étudier directement des clones modifiés. La souche B-11 étant irradiée dans les conditions habituelles, nous avons repris les clones survivants et étudié leur séquence de transfert. Les résultats obtenus après le même type d'analyse avec le mâle Ra-1 nous permettaient de supposer que la modification induite n'était pas létale, donc que cette analyse avait un sens. En outre, ils nous ont incité à analyser un nombre de clones beaucoup plus important, dans l'éventualité d'une instabilité de l'inversion identique à celle qui a été observée avec Ra-1.

L'analyse d'un grand nombre de clones aussi bien dans le témoin que parmi les survivants présentait en outre deux avantages :

- cela nous permettait d'avoir une réponse statistiquement acceptable.

- nous pouvions ainsi savoir si la distorsion du gradient fréquemment observée pour les marqueurs distaux, dans la suspension non irradiée est due à la présence spontanée de Hfr à séquence de transfert différente de celle de B-11, et si une relation pouvait exister entre cette observation et l'induction de l'inversion. L'importance de la distorsion des courbes de gradients indique (Fig. E1) que la proportion de ces Hfr devrait être de 1 % environ (Fig. E2-B, dose 0), suivant la localisation de leur origine de transfert par rapport aux marqueurs Leu et Pro_B en particulier.

La dose choisie correspond à une survie des mâles de 10^{-3}, soit une fréquence d'inversion de 5 % environ, d'après la courbe de la figure F6. La séquence de transfert a été déterminée par la méthode des répliques sur milieux sélectifs

ensemencés avec une souche femelle. La méthode a été contrôlée pour un certain nombre de clones par des croisements en milieu liquide suivant la technique habituelle. Elle s'est avérée fiable dans 95 % des cas, précision suffisante pour le type de réponse attendu.

Cette analyse (tab. E2) permet de tirer les conclusions suivantes :

a) Aucun clone possédant un type de transfert stable différent de B-11 ou d'un F^+ n'a été trouvé parmi les 619 clones analysés dans le témoin. Si de tels Hfr existent, ils représentent donc moins de 0,1 % de la population, quantité insuffisante pour expliquer la distorsion des courbes de gradient. La possibilité n'est pas exclue qu'ils existent de façon instable.

b) Les proportions des différents types de mâles parmi les clones survivants à l'irradiation sont les mêmes que celles du témoin. L'anomalie de transfert induite n'est plus décelable à ce niveau. Il faut donc admettre qu'elle est instable, les cellules modifiées retournant ensuite à leur type d'origine, ou qu'elle est létale. Aucun argument ne permet jusqu'ici de choisir entre ces deux possibilités, si ce n'est l'analogie avec le cas de la souche Ra-1. Cette présomption en faveur de l'instabilité sera confirmée par une étude de la durée de vie de l'inversion induite (Chap. F).

c) Ce type d'analyse ne permet pas de résoudre le problème qui était posé, à savoir définir précisément l'origine et la direction de transfert induites, et suivre le facteur sexuel au cours de l'induction. Une autre approche a alors été envisagée.

2) Etude des recombinants

a) Principe - L'anomalie de transfert induite apparaîssant instable ou non viable, il fallait l'étudier dès l'induction. Nous avons alors pensé qu'elle pourrait être "fixée" dans les recombinants formés au cours d'un croisement effectué immédiatement après irradiation, et qu'elle pourrait être étudiée à ce niveau. Cette méthode présente l'avantage de permettre de travailler sur l'ensemble de la population, quel que soit l'influence de l'inversion sur la viabilité des mâles. L'analyse de leur génotype peut porter sur deux aspects :

-- l'analyse de leur génotype reflète la séquence de transfert. La précision dans la localisation de l'origine dépend de la densité en marqueurs de la région impliquée. La souche B-11 présente l'avantage d'avoir son origine normale et probablement son origine induite, dans la région Lac, bien connue et riche en marqueurs. Le principe de cette analyse est le suivant : pour une dose suffisamment élevée, la majorité des recombinants sélectionnés pour un des marqueurs distaux de B-11 pour lesquels l'inversion de transfert est la plus sensible, sera la conséquence d'un croisement "anormal". Le degré de liaison de ces marqueurs aux autres gènes reflète cette séquence, et permettra de la définir par comparaison avec l'analyse du témoin.

-- L'étude de la transmission du facteur sexuel. Dans des conditions normales, une durée suffisante (de l'ordre de 120 min.) de croisement permet la transmission du facteur sexuel d'un Hfr à quelques % des recombinants sélectionnés pour un marqueur distal, résultat en accord avec l'intégration du F dans le génôme bactérien.

Comme corollaire, on peut localiser le facteur sexuel par son degré de transmission à divers types de recombinants. Un déplacement de F, une inversion de la séquence de transfert

due à un simple retournement du F, ou même la présence de deux facteurs sexuels intégrés, doivent pouvoir être mis en évidence par l'analyse du type sexuel des recombinants. Nous avons en particulier étudié la cotransmission de F et des marqueurs situés immédiatement en tête et en queue du chromosome, selon les séquences de transfert normale et induite probable. Le principe de l'analyse est schématisé dans le tableau E3.

b) Analyse génétique des recombinants - L'analyse génétique des recombinants a été effectuée après croisement avec une souche femelle possédant un nombre élevé de marqueurs dans la région Leu - Lac - Trp (Fig. E7). Les marqueurs de sélection ont été choisis de manière à avoir un marqueur proche de l'origine (Pur_E) et un marqueur distal (Leu). La direction probable de transfert induite par l'irradiation indiquerait qu'alors les positions relatives de ces deux marqueurs devraient être inversées : Leu se trouverait en début du chromosome, Pur_E en queue. Le facteur F devrait être lié à plus forte fréquence au gène Pur_E. La variation du degré de liaison des marqueurs a été étudiée à une dose de rayons γ correspondant à une survie des mâles de 10^{-3}. A cette dose, environ 5 à 10 % de la population sont induits à modifier leur transfert. 1/$_{oo}$ au plus des recombinants Leu^+ Str^r et Pur_E^+ Str^r sont dûs au transfert suivant les séquences normale et induite, respectivement, dans l'hypothèse d'une inversion simple du transfert par irradiation. On peut considérer avec une marge de sécurité suffisante que les recombinants Leu^+ Str^r sélectionnés après un croisement avec le mâle irradié sont issus du transfert suivant le mode "anormal", alors que les recombinants Pur_E^+ Str^r résultent d'un transfert normal.

La comparaison avec le témoin fait apparaître les points suivants (tabl. E4) :

- L'analyse des recombinants Leu$^+$ Str^r, par contre, montre une diminution de la liaison de tous les marqueurs à Leu, par irradiation. On peut noter que les pourcentages de liaison des divers marqueurs obtenus après irradiation sont tous du même ordre de grandeur, à l'exception peut-être du gène T4^s . La faible valeur de cette liaison (1 à 10 %) suggère que Leu est transféré avant ces marqueurs, et que ces derniers sont groupés sur une petite région du chromosome.

La non concordance du résultat concernant le gène T4^s peut être due à un artefact provenant de la technique d'analyse

c) Analyse du type sexuel des recombinants - Cette analyse a été effectuée sur les clones de recombinants précédemment isolés et utilisés dans l'analyse des génotypes présentés ci-dessus. Les marqueurs de sélection Pur_E et Leu sont choisis en fonction de leur localisation chromosomique, comme nous l'avons expliqué plus haut.

Les résultats obtenus nous ont conduits à reprendre cette analyse chez des recombinants issus d'un croisement avec une autre femelle, au cours d'une expérience indépendante. Il nous a en effet semblé pertinent de rechercher la position du facteur sexuel par rapport aux marqueurs Trp , Pro_B , Arg_B , et Leu, qui servait de marqueur de référence.

Un problème s'est posé quant au choix de la méthode de détermination du sexe des recombinants. La technique des répliques a été utilisée de deux façons, par la réponse des clones vis à vis d'une souche femelle ou d'une souche mâle. Les résultats de ces deux versions du même test se sont avérés en désaccord. Deux causes possibles à ceci sont la possibilité de croisement entre deux souches mâles, dans le cas de la réponse vis à vis d'une souche indicatrice mâle, ou l'utilisation comme marqueur de contre-sélection des cellules parentales, de fonctions d'auxotrophie.

Cependant, on a observé constamment une variation dans la dimension des colonies de recombinants, phénomène qui semble indépendant de la technique, mais plutôt caractéristique des cellules examinées. Devant la difficulté de caractérisation par cette méthode, nous avons envisagé d'effectuer des contrôles par croisement en milieu liquide de clones ayant donné des résultats typiques au cours des tests par réplique. Cette technique est beaucoup plus laborieuse, ce qui diminue la quantité de clones analysables. Un essai effectué sur 22 clones choisis pour la diversité de leur réponse à l'analyse précédente a abouti à des conclusions en désaccord avec les précédentes, sans pour autant permettre une classification nette : en effet, une gamme étendue de fréquences de transmission a été observée, depuis des fréquences proches de celles des mutations réserves des caractères utilisés, jusqu'à des fréquences caractéristiques de souches Hfr. Il a donc été à peu près impossible par ce type de méthode non seulement de différencier un Hfr d'un F^+ , mais même un mâle d'une femelle, aussi bien dans les recombinants issus de B-11 non irradié qu'après irradiation (tabl. E5).

Ces mêmes techniques ont été utilisées pour l'analyse du type sexuel des survivants à l'irradiation (IV, 1°), sans difficulté majeure ni dans l'appréciation des résultats des tests par réplique, ni dans la concordance entre ceux-ci et les contrôles effectués par croisement en milieu liquide. Les difficultés apparues ici sont-elles fortuites, ou représentent-elles une caractéristique du système ?

Pour alléger l'analyse, nous avons alors fait une différenciation mâles-femelles en utilisant la sensibilité spécifique des mâles à un phage RNA. Tous les clones donnant une réponse nette de résistance au phage μ (provenant du Lab. du Dr. Devoret) ont été considérés comme n'ayant pas reçu le facteur sexuel, et n'ont pas été davantage étudiés. Le reste des colonies se divise en deux catégories :

-- certains clones ont montré une nette sensibilité au phage μ , et ont été considérés comme des mâles ;

-- une proportion variable selon les types de recombinants analysés, a donné une réponse douteuse, qui ne permettait pas de les caractériser.

Pour plus de sécurité, les clones "sensibles" et les "douteux" ont été analysés une deuxième fois par le même test, avec une concordance des résultats assez variable, et une troisième fois suivant une autre technique. Celle-ci a consisté à mesurer la proportion de cellules résistantes à μ dans des cultures fraiches de ces clones. Ici encore les résultats n'ont pas toujours été en accord avec ceux des premières analyses (tabl. E6).

Le tableau E7 résume l'ensemble des données acquises en vue de caractériser le type sexuel des recombinants, par les différentes méthodes utilisées. Les conclusions principales que nous pouvons en déduire sont les suivantes :

-- le fait le plus évident est la difficulté d'obtenir des résultats clairs, pour un caractère normalement facile à identifier.

-- en ce qui concerne les témoins : les résultats sont dans l'ensemble en accord avec ce que l'analyse théorique prévoit (tabl. E3).

3) Deux remarques s'imposent : Le facteur sexuel est très peu transmis aux recombinants $\underline{Pro}_B^+$ $\underline{Str}^r$, alors que ce marqueur n'en est distant que de 3 min. au maximum. Par contre, la fréquence de liaison Leu -F' est plus élevée que ne le laisse prévoir leur distance relative (9 min.).

Quelle est la valeur statistique de ces deux remarques ? S'agit-il d'un artefact dû aux techniques ou à la nature des mutations Leu et $\underline{Pro}_B$ portées par les femelles ?

On peut se demander s'il ne faut pas rapprocher la distorsion du gradient qui a été décrite au début de ce chapitre (I, et Fig. E1) de ces deux observations. Il vient alors immédiatement à l'esprit que ces anomalies seraient l'indication d'une transposition du marqueur $\underline{Pro}_B$ de B-11 qui serait placé probablement dans la région de $\underline{Arg}_B$. Nous n'avons pas cherché à confirmer cette éventualité, confirmation qui ne pourrait être obtenue que par la détermination des marqueurs pouvant être cotransduits avec $\underline{Pro}_B$.

-- L'irradiation préalable de B-11 conduit à une diminution de la liaison Leu -F, pour laquelle aucune compensation n'a pu être mise en évidence, par une augmentation de la liaison de F à un autre marqueur.

Un attachement de F à l'extrémité $\underline{Pro}_C$ du chromosome de B-11 ne pourrait être décelé par ces techniques que par l'analyse d'un très grand nombre de recombinants $\underline{Pro}_C^+ \underline{Str}^r$, étant donné que la grosse majorité de ces recombinants est formée à la suite d'un transfert suivant la séquence normale de B-11.

V - CONCLUSIONS

L'inversion de transfert après irradiation mise en évidence chez B-11 est dans l'ensemble comparable à celle qui a été décrite chez Ra-1.

- Elle est produite avec une efficacité et suivant une cinétique en fonction de la dose, comparables.

- Elle donne lieu à une seule séquence de transfert nouvelle, caractéristique de la souche.

- Bien qu'il n'ait pas été possible d'isoler un mâle inversé stable après irradiation de B-11, il est probable que la direction de l'inversion est due à son instabilité, comme chez Ra-1, et non à une létalité intrinsèque.

Cependant plusieurs différences, dont il est difficile d'estimer l'importance à ce point du travail, doivent être retenues :

- L'emplacement de l'origine de transfert induite : malgré l'impossibilité de la localiser de façon très précise par les techniques utilisées, il est probable qu'elle se trouve au même endroit que, ou très proche de celle de B-11. Nous ne pouvons pas dire si l'inversion de transfert est liée à une réorientation de F, seul ou avec un court segment de chromosome. Il est probable qu'il existe une relation entre les emplacements de ces deux origines, alors que l'origine induite chez Ra-1 ne semble pas déterminée par l'emplacement initial de F.

- La deuxième différence réside dans la singularité de B-11 par rapport aux autres mâles isogènes que nous avons étudiés. Alors que chez les mâles du groupe Ra-1, la capacité d'inversion de transfert et les caractéristique du transfert induit semblent être une propriété du groupe, ici il parait plus probable qu'elles n'existent que chez B-11. On est conduit à penser que B-11 a acquis cette propriété au moment de l'intégration de F dans son chromosome. Ceci, apparemment, n'a pas eu de conséquence sur la stabilité du caractère Hfr de B-11.

L'inversion du transfert n'a pas pù être expliquée par un déplacement du facteur sexuel, comme on aurait pu le penser a priori. La diminution de la liaison de F au gène Leu provoquée par l'induction (tabl. E7) reflète probablement uniquement le fait que l'origine de transfert induite se trouve entre ces deux points, et introduit dans cette région une solution de continuité pendant le transfert consécutif à l'irradiation.

Un modèle tel que celui qui est indiqué dans la figure E8 pourrait rendre compte des résultats obtenus ; F serait ingétré à un site tel que l'homologie entre les régions d'attachement lui permette d'ouvrir le chromosome à l'une ou à

l'autre de ses extrémités, avec des probabilités de presque 1 (injection normale) et de 10^{-2} à 10^{-3} (injection inverse) sans irradiation pour chaque cellule. L'irradiation aurait pour effet d'augmenter la probabilité d'ouverture dans le sens "anormal". Cet effet n'étant pas létal (contrairement à l'induction d'un prophage), les cellules reprennent ensuite leur comportement normal.

Ce modèle implique que le transfert inverse ne se fasse pas d'après le mode "classique" actuellement admis, suivant lequel l'orientation de F définit obligatoirement la direction d'injection, F poussant le chromosome devant lui. La possibilité de mécanismes de transfert "anormaux", sans intégration de F dans le chromosome, a été suggérée depuis longtemps (voir Chapitre B, § V). Une action indirecte ou déviée de son site normal d'un F intégré peut aussi bien être envisagée.

La suite de ce travail essaiera de définir les conditions métaboliques d'apparition et de disparition de l'inversion de transfert. Le but à atteindre serait de contrôler le fonctionnement du facteur sexuel pendant le transfert "inverse".

°°° °°°

°°°

FIGURE E 1

GRADIENT DE TRANSFERT DE Hfr B-11

Une culture en phase exponentielle de croissance de B-11, en milieu complet, est croisée pendant 90 min., avec chacune des deux souches réceptrices indiquées, à raison de 1 Hfr pour 10 F^- . Les recombinants suivants sont titrés sur les milieux sélectifs appropriés :

(1) B-11 x PA 3344 :

$\underline{Trp}^+\underline{Str}^r$, $\underline{Pur}_G^+\underline{Str}^r$, $\underline{Arg}_B^+\underline{Str}^r$, $\underline{Leu}^+\underline{Str}^r$, $\underline{Pro}_B\underline{Str}^r$

(2) et (3) B-11 x PA 309 :

$\underline{Trp}^+\underline{Str}^r$, $\underline{His}^+\underline{Str}^r$, $\underline{Arg}_B^+\underline{Str}^r$, $\underline{Leu}^+\underline{Str}^r$

Les courbes représentent les fréquences de transmission (nombre de recombinants/nombre de Hfr totaux en début de croisement) en fonction de la séquence de transfert de B-11.

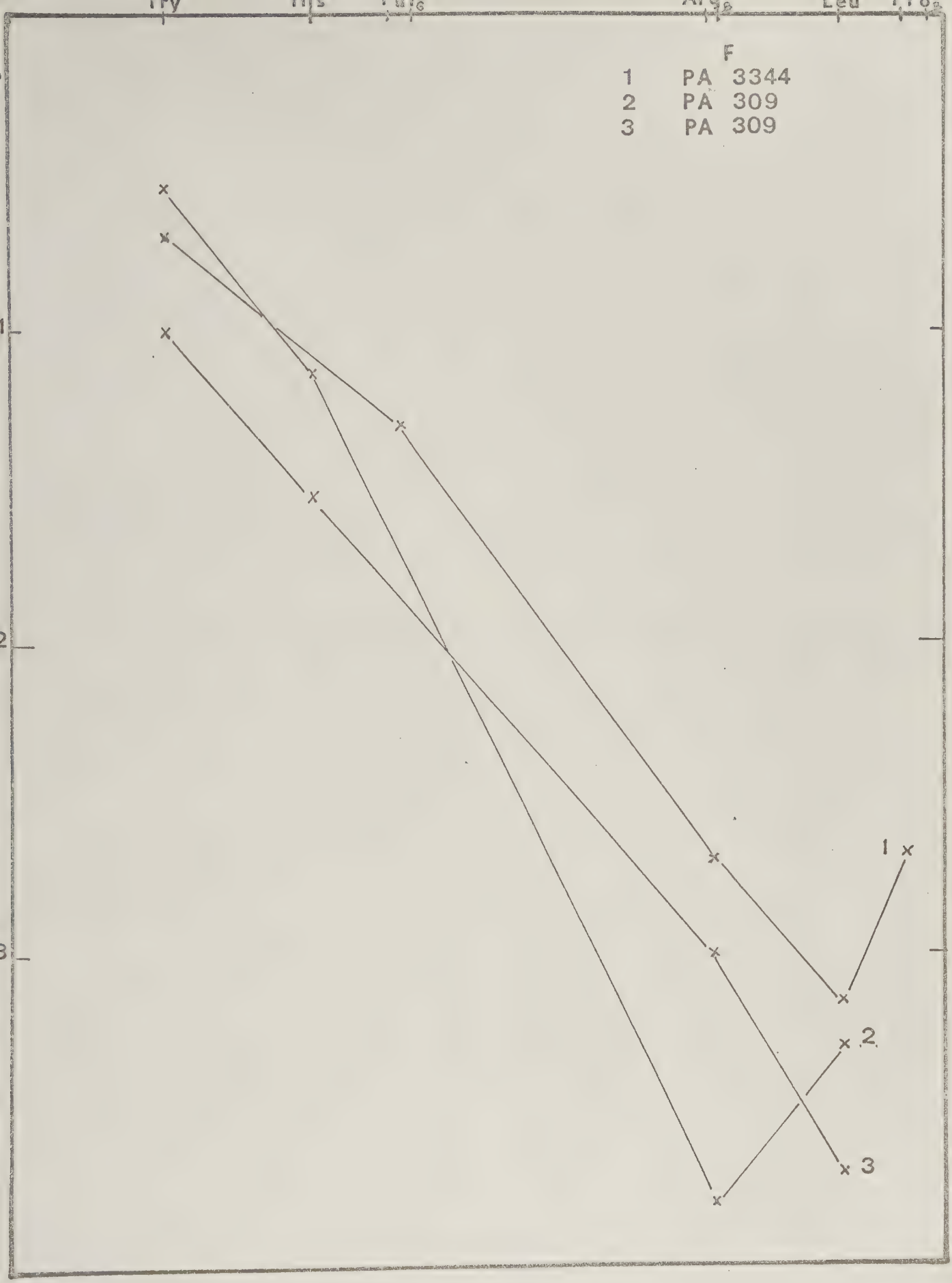


Fig E1

FIGURE E 2

EFFET DE L'IRRADIATION DE B-11 PREALABLE AU CROISEMENT

Une culture en phase exponentielle de croissance de B-11 , en milieu complet, est irradiée, à 0°C, aux rayons γ du ^{61}Co , dans son milieu de croissance. L'irradiation est effectuée par doses cumulatives. Un prélèvement fait à chaque dose sert à mesurer la survie immédiatement et à effectuer un croisement, dans les conditions habituelles (voir Fig. E1) avec la femelle PA 3344. La proportion des deux souches est de 10 F^- pour 1 mâle, calculée sur la quantité totale de cellules mâles présentes dans la suspension.

Débit de la source de ^{61}Co : 4500 r/min. environ.

A - Courbes de "survie" de la transmission des marqueurs (nombre de recombinants à chaque dose/nombre de recombinants de même type à la dose 0) en fonction de la dose. La courbe de survie des mâles est indiquée.

B - Variation du gradient de transfert en fonction des doses reçues par le mâle.
Même expérience que dans la partie A.

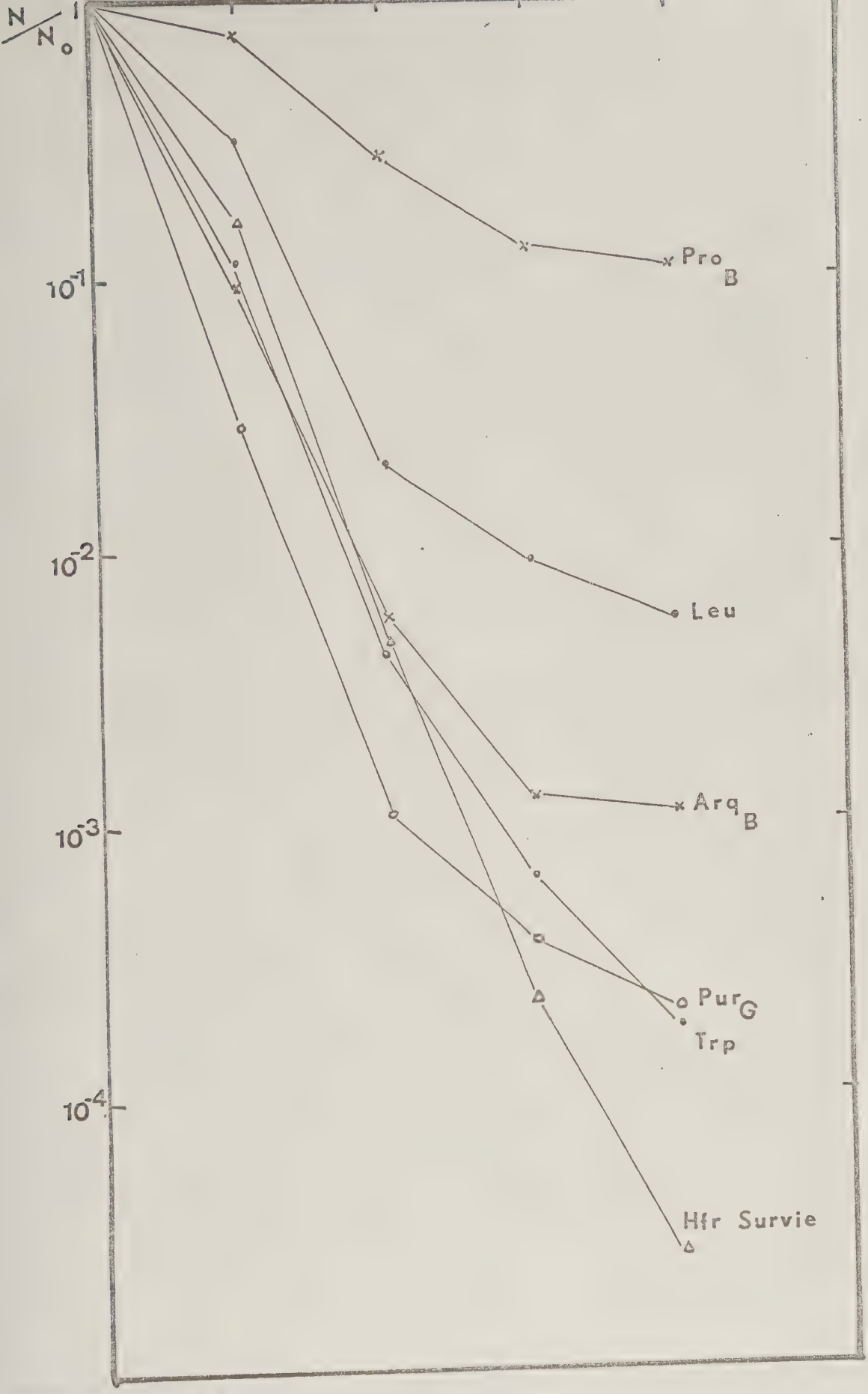


Fig E2-A

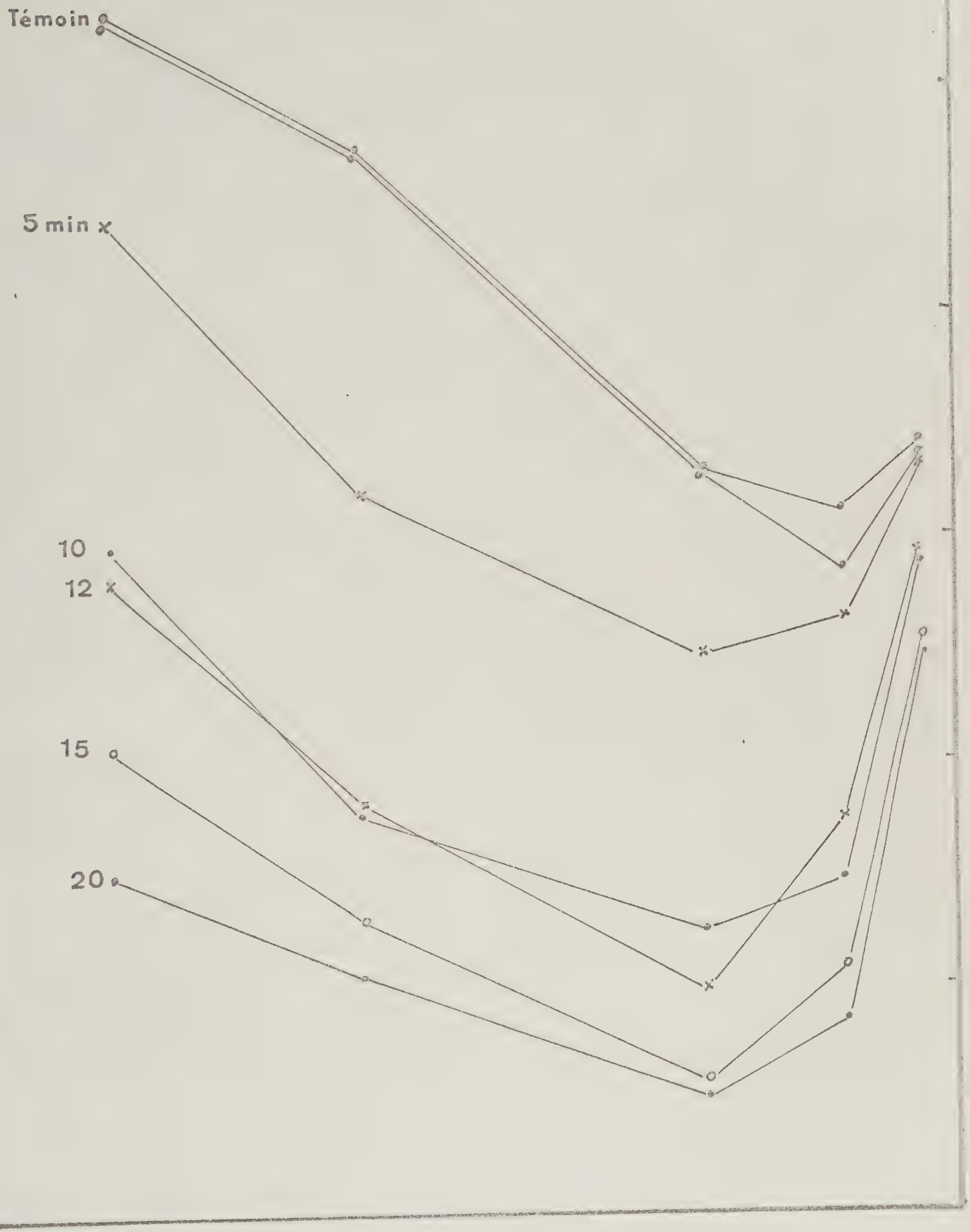


Fig E2-B

FIGURE E 3

ANALYSE DE LA TRANSMISSION DES CARACTERES NON SELECTIONNES

Culture, irradiation et croisement de B-11 dans les mêmes conditions que pour la figure E2. Croisement avec la F^- PA 309. Environ 200 colonies de chaque type de recombinants sont repiqués sur leur milieu de sélection, et analysés par réplique sur les milieux appropriés, pour tester les caractères non sélectionnés.

Les résultats sont donnés en % de recombinants ayant hérité l'allèle du mâle de chacun des autres caractères étudiés, en fonction de la dose reçue par le mâle.

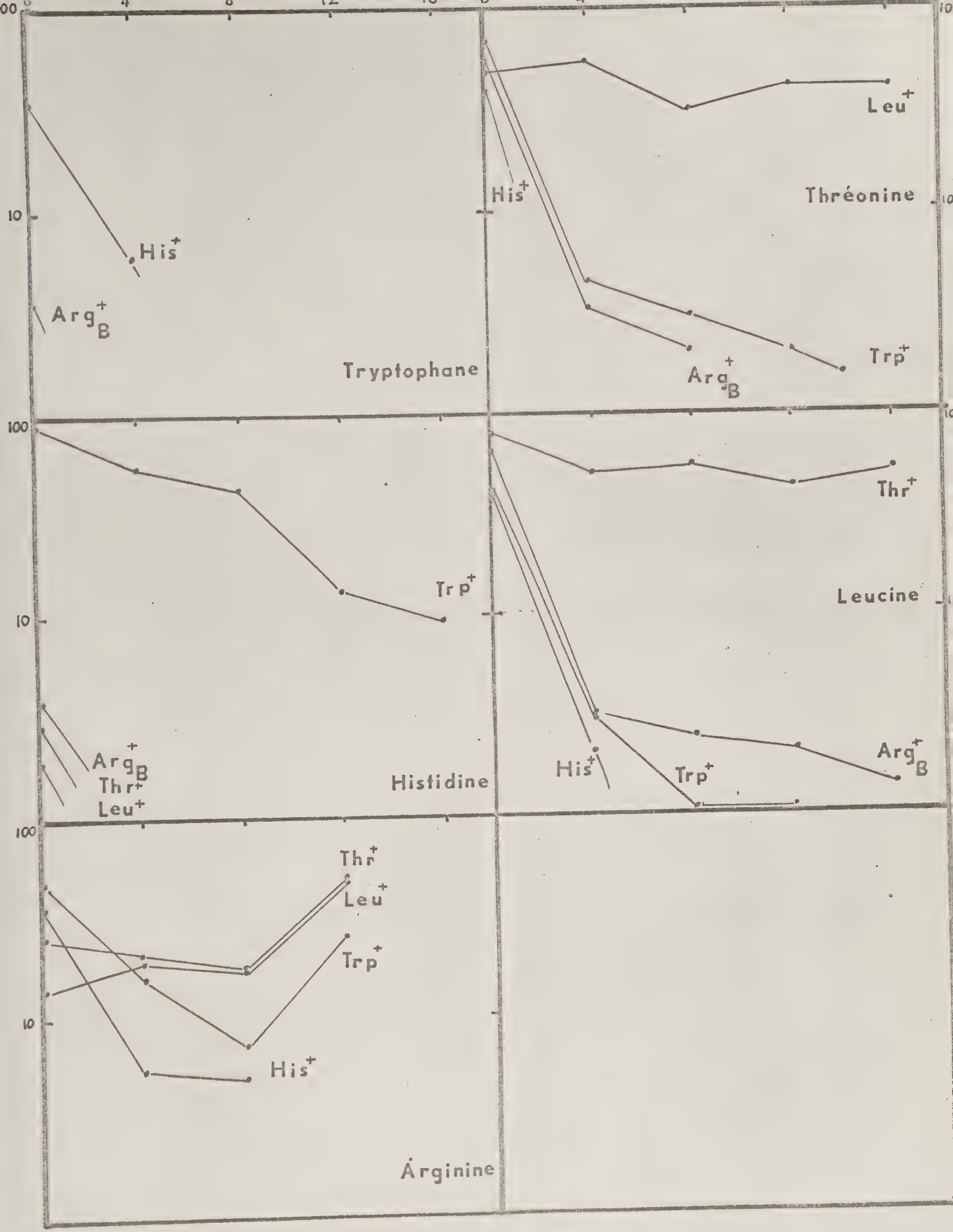

100
10
His+
Arg+B
Tryptophane
Leu+
His+
Thréonine
Arg+B
Trp+
100
10
Trp+
Arg+B
Thr+
Leu+
Histidine
Thr+
Leucine
His+
Trp+
Arg+B
100
10
Thr+
Leu+
Trp+
His+
Arginine

Fig E 3

FIGURE E 4

EFFET DE L'IRRADIATION SUR LA TRANSMISSION DES MARQUEURS DES Hfr B-1 et B-9

Modalités expérimentales identiques à celles décrites pour la figure E2. Croisement avec la F^- PA 309.

A - Courbes de survie des mâles et de la transmission des marqueurs mâles en fonction de la dose.

B - Variation du gradient de transfert.
Mêmes expériences que dans les figures A.

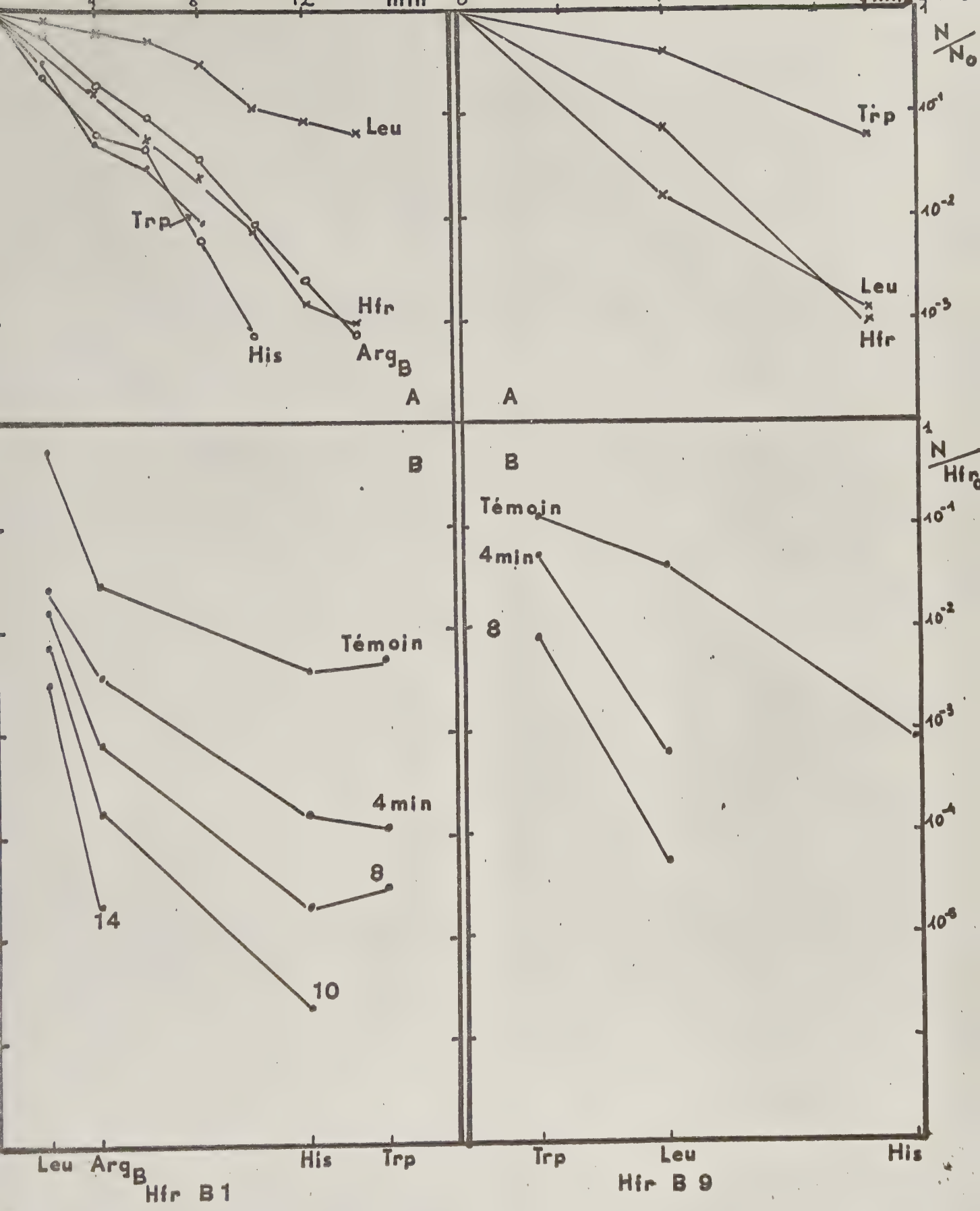
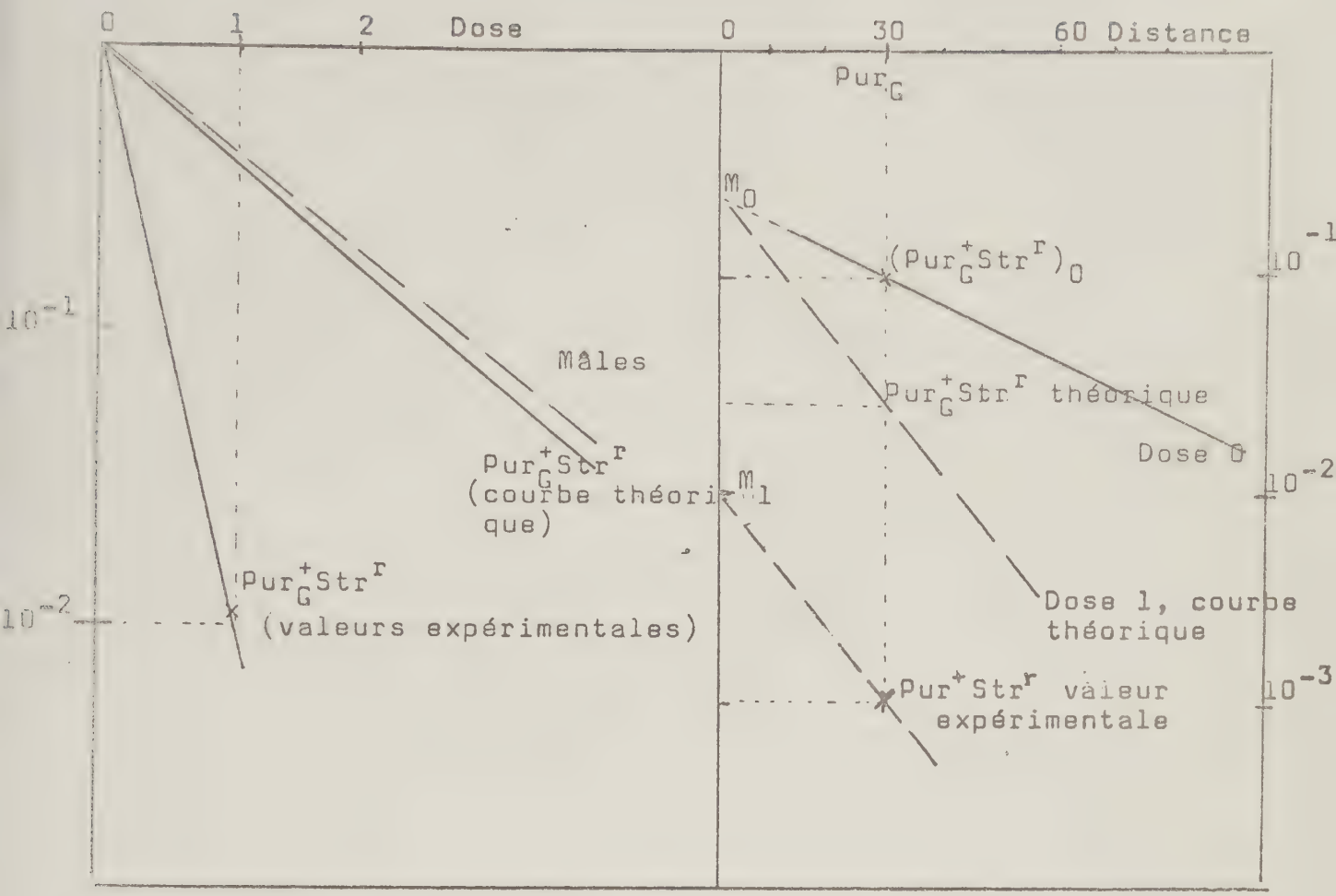

Leu
Trp
Hfr
His
Arg B
A
A
Trp
Leu
Hfr
N/N0
10-1
10-2
10-3
B
B
Témoin
4min
8
14
10
Leu
Arg B
Hfr B 1
His
Trp
Trp
Leu
His
Hfr B 9

Fig E 4

FIGURE E 5



A : courbes de survie B courbes de gradients

FIGURE E 6

CINETIQUE D'APPARITION DU TRANSFERT "INVERSE" ET DE DISPARITION DU TRANSFERT NORMAL DE B-11

Les valeurs sont celles qui ont été calculées dans le tableau E1, à partir des résultats de l'expérience décrite dans la figure E2. La courbe de survie des mâles a été rappelée.

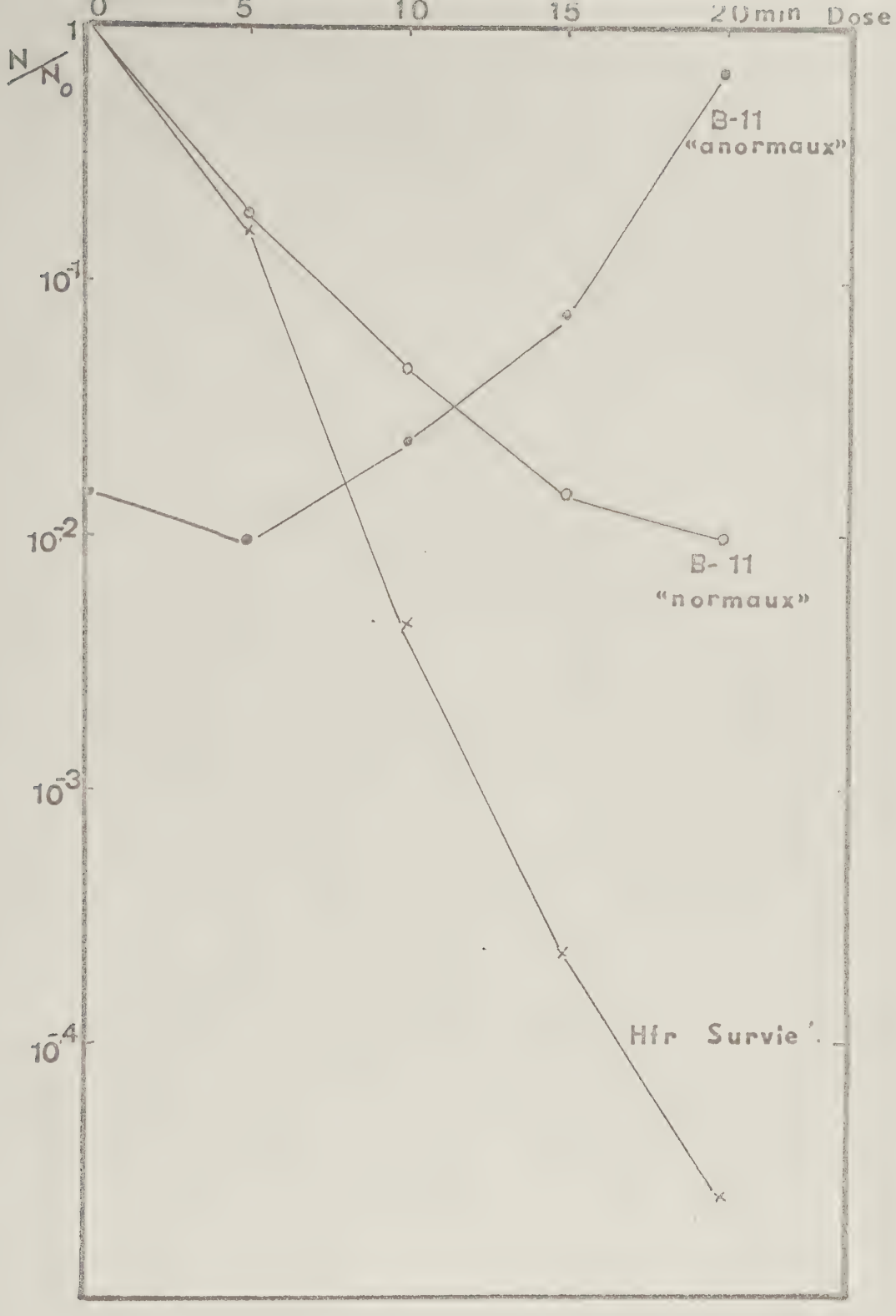

0
5
10
15
20mn Dose
1
N/N0
10-1
10-2
10-3
10-4
B-11
"anormaux"
B- 11
"normaux"
Hfr Survie

Fig E 6

FIGURE E 7

PREPARATION DE RECOMBINANTS PROXIMAUX ET DISTAUX ISSUS DE B-11 IRRADIE OU NON

Une culture de B-11 est préparée, irradiée aux rayons γ et croisée dans les conditions habituelles (Fig. E2). La souche réceptrice est un mutant de AB 2345 résistant aux phages T4 et T6. Les doses ont été choisies de manière à avoir une survie de 10^{-3} environ.

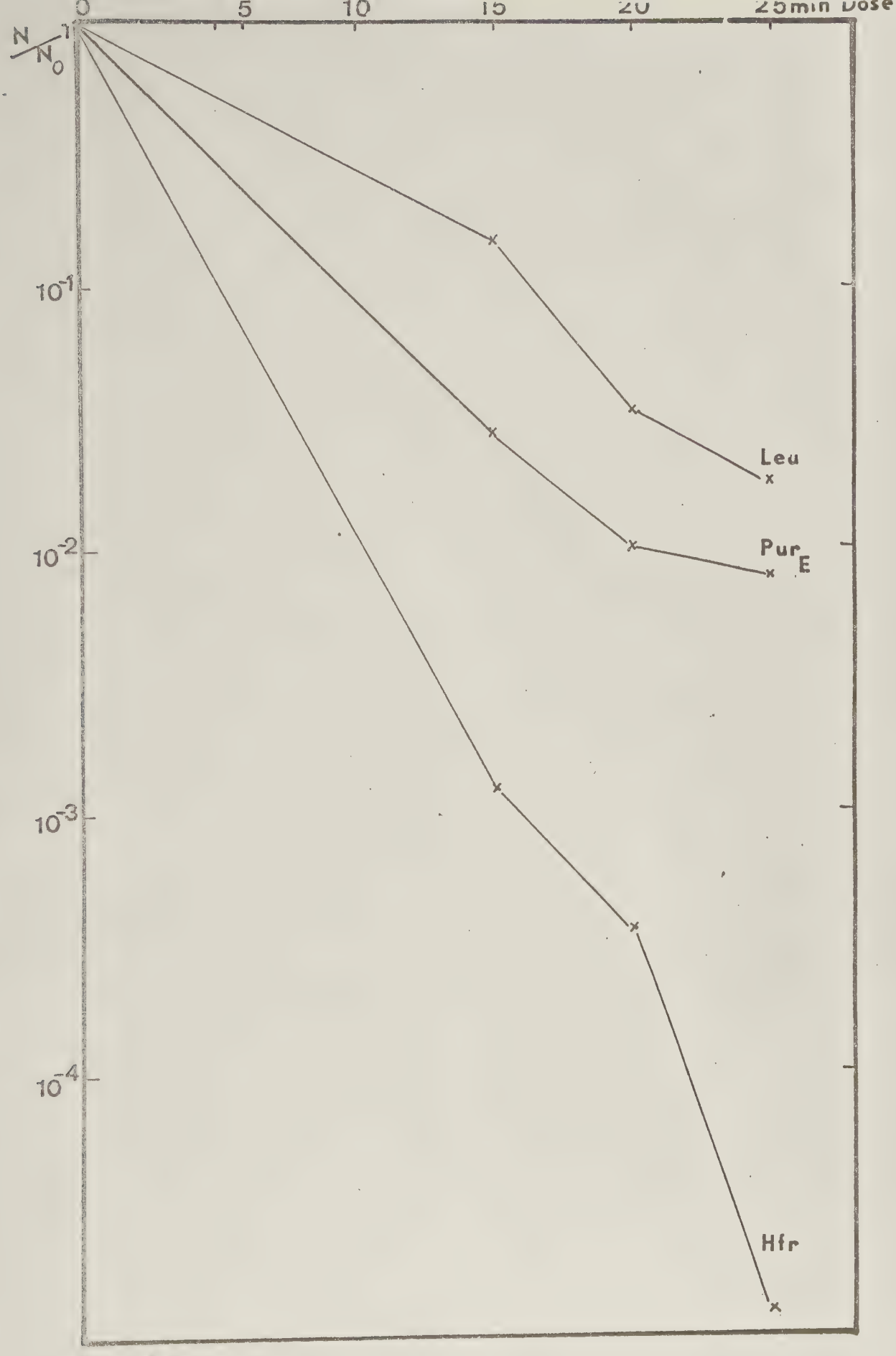


Fig E 7

TABLEAU E 1

CALCUL DE L'EFFICACITE D'INVERSION DE B-11

Expérience décrite figure E2.

Disparition des cellules transférant suivant la séquence norm

L'inactivation du transfert se fait avec une efficac trois fois plus grande que la mort des cellules (Marcovich 19 Chap. C, § II). Un marqueur du mâle situé à 1/3 de la longueu du chromosome à partir de l'origine de transfert aura la même sensibilité d'inactivation de transfert que la survie des mâles. On peut alors reconstituer la courbe de "survie" de ce marqueur (ici Pur_G , ligne 2) (voir Fig. E5-A). Les valeurs o tenues à chaque dose permettent de tracer les courbes de gradient de transfert théoriques (Fig. E5-B), sachant que ces co bes extrapolent au même point sur l'axe des ordonnées. Ce poi d'intersection est proportionnel au nombre de mâles ayant effectivement participé à la conjugaison (Wood et Marcovich 196 et Chap. C, § III). Les pentes des courbes ainsi obtenues son reportées aux valeurs expérimentales de recombinants Pur^+_G Str obtenus à chaque dose (Fig. E5-B). L'extrapolation de ces cou bes à l'axe des ordonnées donne des valeurs proportionnelles au nombre de mâles ayant transféré suivant la direction norma le (Fig. E5-B, et ligne 3).

Apparition des cellules transférant en direction inverse.

Le principe du calcul est identique. Le marqueur utilisé est Arg_B , situé environ au tiers du chromosome à partir de Lac, en sens inverse.

On peut calculer la cinétique de diminution du trans fert normal (ligne 4), la cinétique d'apparition du transfert inverse (ligne 7), et l'efficacité d'apparition de l'inversion (ligne 8).

TABLEAU E 1

Doses (min.; γ du Co).	0	5	10	15	20
Survie des mâles	1	$1,6.10^{-1}$	4.10^{-3}	$2,5.10^{-4}$	$2,5.10^{-5}$
Quant. théoriques de recomb. $Pur^+_E Str^r : \frac{(Pur^+)_D}{(Pur^+)_0} = \frac{(Mâles)_D}{(Mâles)_0}$	$1,2.10^{6}$	$1,9.10^{5}$	$4,8.10^{3}$	3.10^{2}	3.10^{1}
Nombre de mâles ayant transféré normalement (x 1/2) (Extrapol. à distance 0 des gradients, M_0, M_1, fig E5-B	$1,3.10^{7}$	$3,2.10^{6}$	6.10^{5}	2.10^{5}	$1,5.10^{5}$
Diminution du transfert normal: $\frac{M}{M_0}$ de la ligne 3	1	$1,9.10^{-1}$	$4,6.10^{-2}$	$1,5.10^{-2}$	1.10^{-2}
Quant. Théoriques de recomb. $Arg^+ Str^r$ (transfert inverse) $\frac{Arg^+}{Arg^+_0} = \frac{Mâles}{Mâles_0}$	$6,5.10^{4}$	1.10^{4}	$2,6.10^{2}$	$1,6.10^{1}$	1,6
Nombre de mâles ayant transféré en sens inverse (x 1/2) (extrapol. à distance 0 des gradients "inverses")	3.10^{5}	2.10^{5}	$4,6.10^{5}$	$1,5.10^{6}$	$1,3.10^{7}$
Fréquence d'inversion $\frac{Mâles\ inverses\ (6)}{Mâles\ totaux\ (6+3)}$	$1,5.10^{-2}$	1.10^{-2}	$2,3.10^{-2}$	$7,5.10^{-2}$	$6,5.10^{-1}$
Efficacité d'inversion $\frac{Mâles\ inverses}{Mâles\ inverses\ dose\ 0}$	1	6,6.10	1,5	5	40

Nombre de mâles totaux: 2.10^{7}/ml
Nombre de recomb. $Arg^+ Str^r$, dose 0: $6,5.10^{4}$/ml
Nombre de recomb $Pur^+ Str^r$, dose 0: $1,2.10^{6}$/ml

TABLEAU E 2

ANALYSE DU CARACTERE SEXUEL DES CLONES DE B-11 AYANT SURVECU A L'IRRADIATION

A - Analyse par réplique

Des colonies de B-11 sont repiquées à partir de l'expérience décrite figure E2. Après croissance, elles sont répliquées sur les milieux sélectifs préalablement ensemencés avec environ 10^8 cellules/boîte de la souche PA 3344. Les recombinants sélectionnés sont : $Trp^+ Str^r$ et $Pro^+_B Str^r$.

Les résultats sont donnés en pourcentages du total, pour chaque type de transfert, après vérification pour les réponses douteuses (B).

Tout un groupe de colonies (deuxième colonne) a donné systématiquement, après plusieurs essais, des réponses ininterprétables. Nous n'en avons pas tenu compte dans les calculs précédents. Ces colonies n'ont pas été davantage analysées.

B - Croisement en milieu liquide

Sept clones pris dans les témoins, qui avaient donné des résultats douteux dans l'analyse précédente (A) ont été cultivés en milieu complet liquide et croisés dans les conditions habituelles avec la souche réceptrice. Les recombinants sélectionnés sont $Trp^+ Str^r$ et $Pro^+_B Str^r$. Les clones analysés ont été considérés comme représentatifs ; les réponses douteuses ont donc été classées comme Hfr B-11 (5/7)

F^+ (2/7)

Les réponses nettes obtenues par réplique se sont trouvées vérifiées au cours des croisements en milieu liquide.

TABLEAU E 2

A ANALYSE PAR REPLIQUE SUR F^- PA 3344

	Témoins	Irradié	
Nombre de clones analysés	619	841	364
% de cellules			
transfert normal recomb. $Trp^+ Str^r$	86	83	?
transfert anormal recomb. $Pro_B^+ Str^r$	$\leqslant 0,1$	$\leqslant 0,1$	?
F^+	14	17	?
résultats douteux	—	—	100

B VEREFICATION DE CES RESULTATS PAR CROISEMENT EN MIL. LIQUIDE

Nombre de clones analysés	Résultat précédent	Vérification
13	Hfr B-11	13 Hfr B-11
7	Hfr?	2 F^+ 5 Hfr B-11
2	F^+	2 F^+

TABLEAU E 3

PRINCIPE DE L'ANALYSE DU CARACTERE SEXUEL DES RECOMBINANTS ISSUS DE B-11 IRRADIE OU NON

Séquence de transfert	← PurE Trp ---------- ArgB Leu ProB F					Témoin
Distances	0 4 14 67 79 85 89					
Caractère mâle sélectionné	Pur_E	Trp	Arg_B	Leu	Pro_B	
Fréquence de liaison à F (%) approx.	$\ll 1$	< 1	1 - 10	1 - 10	10 - 90	
Séquence de transfert probable	← ProB Leu ArgB ---------- Trp PurE F					Irradié
Distances	0 4 10 22 75 85 89					
Caractère mâle sélectionné	Pro_B	Leu	Arg_B	Trp	Pur_E	
Fréquence de liaison à F (%) approx.	$\ll 1$	< 1	< 1	1 - 10	10 - 90	

La séquence de transfert après irradiation est la séquence probable que l'on peut déduire des résultats décrits précédemment (Fig. E2 et E3). On a supposé que le facteur sexuel avait été réorienté par rapport à sa position chez B-11 ; et réinséré soit au même point, soit dans un site très proche.

TABLEAU E 4

ANALYSE DE LA TRANSMISSION DES CARACTERES MALES NON SELECTIONN

AUX RECOMBINANTS Leu^+Str^r et $Pur_E^+Str^r$

Les recombinants sont ceux de l'expérience de la figu re E7. Environ 150 colonies de chaque type de recombinants son repiquées sur leur milieu sélectif, et répliquées après crois- sance pour tester les caractères suivants :

Pro_C , Trp , Leu , Pur_E et Lac (milieu EMB)

La sensibilité aux phages T4 et T6 est testée par ensemencemen par gouttes à l'anse de platine, de quantités de suspensions adéquates sur du milieu complet préensemencé avec le phage. Les quantités de phages et de cellules ont été déterminées dans des expériences préliminaires.

TABLEAU E 4

comb. sélectionnés		Pur$^+$Str^r				Leu$^+$Str^r			
		Témoin		Irradié		Témoin		Irradié	
rqueurs mâle	Temps d'entrée	Nombre colonies	%	Nombre colonies	%	Nombre colonies	%	Nombre colonies	%
Pro_C^+	0,5min	12/154	7,8	20/155	13	51/156	33	6/100	6
6^s	1,5	23	15	19	12	28	18	3	3
Pur_E^+	4,5	—	—	—	—	56	36	8	8
Trp^+	15	49	32	0	$<$0,6	25	16	1	1
Leu^+	81	0	$<$0,6	0	$<$0,6	—	—	—	—
$T4^s$	88	0	$<$0,6	0	$<$0,6	6	3,8	0	$<$1
Lac^+	90	3	2	4	2,6	70	45	12	12

TABLEAU E 5

DETERMINATION DU TYPE SEXUEL DES RECOMBINANTS

$Leu^+ Str^r$ et $Pur_E^+ Str^r$

Comparaison des résultats obtenus par réplique et par croisement en milieu liquide.

Les recombinants étudiés précédemment (Fig. E4) ont été croisés avec la F^- PA 360, soit sur boite (réplique) soit en milieu liquide à partir de cultures fraîches de ces clones.

Les recombinants sélectionnés sont :

$His^+ Trp^+$ et $Arg_B^+ Trp^+$ ou $His^+ Leu^+$ et $Arg_B^+ Leu^+$

suivant le génotype des clones à étudier. Pour les croisements en milieu liquide, les résultats sont donnés en fréquence de transmission par rapport au nombre de cellules "mâles" présentes au début du croisement.

TABLEAU E 5

Recombinants	Test par réplique Type sexuel	Nombre de clones	Croisement en liquide Efficacité de transmission
$Pur_E^+Str^r$ Témoin	♂	1	10^{-6}
	?	4	10^{-5} à 10^{-6}
	♀	1	10^{-3} à 10^{-4}
$Pur_E^+Str^r$ Irradié	♂	1	10^{-5} à 10^{-6}
	?	1	5.10^{-4}
	♀	1	10^{-4} à 10^{-5}
Leu^+Str^r Témoin	♂	1	5.10^{-4} à 5.10^{-5}
	?	5	10^{-3} à 10^{-4}
	♀	1	3.10^{-4}
Leu^+Str^r Irradié	♂	1	10^{-4}
	?	4	10^{-5} à 10^{-3}
	♀	1	10^{-4}

TABLEAU E 6

PROPORTION DE CELLULES RESISTANTES AU PHAGE μ DANS QUELQUES CLONES DE RECOMBINANTS $Leu^+ Str^r$ et $Arg_B^+ Str^r$

Recombinants sélectionnés	Nombre de clones analysés	Nombre de clones ayants des proport: de résistants à μ de:		
		⩾ 10%	10%<->0,1%	< 0,1%
Témoin $Leu^+ Str^r$	5 sensibles	1	–	4
	14 douteux	11	3 (2,5 à 7%)	–
Irradié $Leu^+ Str^r$	10 sensibles	10	–	–
Irradié $Arg_B^+ Str^r$	2 résistants	2	–	–
	8 douteux	8	–	–

Croisements de l'expérience de la figure E2. Un certain nombre de clones de recombinants $\underline{Leu}^+ \underline{Str}^r$ et $\underline{Arg}_B^+ \underline{Str}^r$, qui ont semblé totalement ou partiellement sensibles au phage μ par test global (voir tableau E7) ont été testés de la façon suivante : des cellules fraîches de ces clones, en phase exponentielle de croissance, sont étalées, après dilutions, sur des boîtes de milieu complet ensemencées ou non avec du phage μ . La quantité de phages nécessaires a été déterminée préalablement. Les colonies sont comptées après 24 heures de croissance à 37°C.

TABLEAU E 7

ANALYSE DU CARACTERE SEXUEL DES RECOMBINANTS ISSUS DE B-11

Les recombinants sélectionnés après croisement de B-11 irradié ou non avec AB 2345 (1ère expérience) ou avec PA 334 (2ème expérience) ont été analysés de la façon suivante :

1) Capacité à former des recombinants avec une souche réceptrice. Repiquage et réplique sur milieux sélectifs préensemencés avec la femelle F^- PA 360 (voir tableau E5).

2) Résistance au phage μ : des cultures fraîches de différents clones, en phase exponentielle de croissance en milieu complet (milieu La.10) sont préparées. Des stries à l'anse de Pt sont faites sur des boîtes préalablement striées perpendiculairement avec une suspension de phage μ à 10^{10} phages par ml (environ 10^9 phage/strie). Après 6 heures d'incubation à 40°C, la lecture des boîtes est effectuée. Les clones sont classés en trois groupes : absence de croissance (mâles); croissance partielle (à retester); et croissance complète (femelle).

3) Proportion de cellules résistantes au phage μ dans certains clones analysés dans le paragraphe (2). Voir tableau E6.

Les résultats sont donnés en pourcentages de cellules de chacun des types déterminés.

ombinants ectionnés	Méthode d'analyses	Témoin				Irradié			
		Nombre de clones analysés	Pourcentage de clones ♂	?	♀	Nombre de clones analysés	Pourcentage de clones ♂	?	♀++
r$_F^+$Str^r (1)	Réplique sur F$^-$PA 360	154	0,6	3,2	96,2	155	< 0,6	1,3	98,7
	Résistance à μ	154	0,6	< 0,6	99,4	155	< 0,6	0,6	99,4
rp$^+$Str^r (2)	Résistance à μ	208	< 0,5	< 0,5	99,4	208	< 0,5	< 0,5	99
Arg$_B^+$Str^r (2)	Résistance à μ	102	1	2	97	208	< 0,5	7	93
	% résistants à μ					2 ♀	0	0	100
	% résistants à μ					8 ?	0	0	100
eu$^+$Str^r (1)	Réplique sur F$^-$PA 360	131	3,8	40	56,2	100	< 1	1	99
	Résistance à μ	156	32	25	43	155	8,4	< 0,6	91,6
(2)	Résistance à μ	104	7	46	47	97	< 1	< 1	98
	% résistants à μ	5 ♂	80	0	20	6 ♀	0	0.	100
	% résistants à μ	14 ?	0	0	100				
Pro$_B^+$Str^r (2)	Résistance à μ	198	< 0,5	2,5	97,5	196	< 0,5	< 0,5	99

(1) Première expérience

(2) Deuxième expérience

C H A P I T R E F

IMPLICATIONS DE L'INVERSION DE TRANSFERT AU NIVEAU DE LA REPLICATION

Les résultats qui viennent d'être décrits nous ont co duits aux conclusions qu'aucune modification stable de la stru ture du chromosome ou de la séquence des gènes n'a été induite par les radiations. Aucune réorientation du facteur sexuel n'a même pu être décelée.

Un autre mécanisme d'induction de l'inversion de tran fert a été envisagé, impliquant une modification transitoire. Deux niveaux d'action des radiations peuvent être considérés

a) Une action directe sur structure distincte du D par exemple un des produits de F impliqué dans l'ouverture du chromosome ou dans la réplication de transfert, qui pourrait être modifié et conduirait à une anomalie de transfert.

b) On pourrait aussi penser à une modification sur le chromosome soit du site d'action de ces produits, le rendan inapte à les recevoir, soit d'une autre région du chromosome, qui deviendrait ainsi susceptible de jouer le rôle du site d'a tachement normal. Cette dernière possibilité semble plus vrai- semblable, si l'on pense à la spécificité du phénomène.

L'instabilité (tabl. F2) qui a été observée fait pen- ser que cette modification doit être effacée assez rapidement, par un mécanisme tel que la réparation de l'ADN ou, au cours d'un processus de synthèse normal de la cellule. Par exemple, une modification de structure des chaînes d'ADN, telle que la cassure de l'une des chaînes, pourrait disparaître au passage suivant de la fourche de réplication en ce point.

Il est tentant d'essayer d'expliquer l'inversion de transfert par une modification de l'un des mécanismes de réplication du chromosome d'un Hfr végétatif, ou contrôlé par le facteur sexuel. Des perturbations de la réplication sont en effet induites après irradiation des cellules : arrêt temporaire de fonctionnement de la fourche (Kelner 1953 ; Hewitt et Billen 1964 ; Billen et all. 1965); synthèses de réparation simultanément en divers points du chromosome (Pettijohn et Hanawalt 1964 ; Billen et all. 1967 ; Setlow 1967).

Parmi les modèles proposés pour rendre compte du transfert chromosomique, celui de Jacob, Brenner et Cuzin (1963) implique une régulation entre le système de réplication végétatif et celui du facteur sexuel. La mise en contact des mâles avec des cellules réceptrices induirait le fonctionnement du facteur F, dont l'une des activités serait l'induction d'une nouvelle réplication du chromosome, indépendante de la réplication végétative.

Reprenant l'hypothèse proposée plus haut de l'induction d'un deuxième site possible d'action d'un produit de F, il serait plausible de la compléter ainsi : ce site, qui a une durée de vie courte, sera utilisé par F si un accouplement a lieu suffisamment tôt après l'irradiation. Dès la cessation de la conjugaison F redevient inactif et de ce fait le site d'action induit par les radiations, qui n'est plus utilisé, disparaît.

Ce modèle peut servir de base de travail pour étudier les relations existant entre l'induction de l'inversion de transfert et certains aspects du système de régulation de la réplication chez le mâle B-11.

Le fait que des mâles inversés stables aient été isolés parmi les survivants à l'irradiation de la souche Ra-1 n'est pas nécessairement l'indication d'un mécanisme différent de cel

observé chez B-11. En effet la proportion de mâles inversés stables observée est très faible. Il est cependant probable que les caractéristiques secondaires de l'inversion dans ces deux souches sont différentes, ne serait-ce que parce que l'origine de transfert induite n'a pas la même localisation ni sur le chromosome, ni par rapport à l'origine de transfert normale.

Il a semble intéressant d'élucider les relations pouvant exister entre l'inversion de transfert et la réplication.

I - CARACTERISTIQUES DE LA REPLICATION VEGETATIVE CHEZ B-11

Il nous a semblé utile, en premier lieu, de vérifier que le système de régulation de la réplication chez B-11 correspondait bien aux modèles déjà décrits. Ceci d'autant plus que la plupart des autres travaux ont été effectués sur la souche E. Coli 15, dont un certain nombre de caractères sont assez différents de ceux des souches E. Coli K 12.

Le modèle du réplicon de Jacob, Brenner et Cuzin (1963) implique l'existence d'un gène de régulation, l'initiateur, dont le produit déclenche sur un gène de structure, ou réplicateur (l'origine de réplication) le commencement d'un nouveau cycle. D'autres modèles assez proches ont été proposés (Gilbert et Dressler 1968 ; Rosenberg et all. 1969 ; Pritchard et all. 1969) Ils se différencient par le type de régulation de la synthèse de l'initiateur. Cependant, quel que soit le doute qui subsiste à ce niveau, un certain nombre de faits ont été acquis et interprétés dans le même sens, donnant confirmation de l'essentiel du modèle de Jacob et all. (1963).

a) La réplication est séquentielle. L'achèvement d'un cycle (ou un processus lié) permet le démarrage du cycle suivant. L'initiation de ce cycle nécessite la synthèse d'une (ou de plusieurs) protéine(s)(Bohhoeffer et Schaller 1965 ; Lark 1966 ; Fangman et Novick 1968 ; Kohiyama et all. 1968 ;

Gross et all. 1968 ; Lark et Renger 1969 ; Ward et Glaser 1969 Kogoma et Gross 1970).

Une carence en thymine de cellules déficientes pour la synthèse de cette base modifie l'équilibre normal de régulation de ces cellules et conduit à l'initiation prématurée d'un nouveau cycle de réplication (Barner et Cohen 1956 ; Maaloe et Hanawalt 1961 ; Pritchard et Lark 1964).

b) Le chromosome possède une origine et une direction de réplication fixes (Lark 1966). La localisation de l'origine par rapport aux marqueurs génétiques est relativement constante (Donachie et Masters 1966 ; Cutler et Evans 1967 ; Abe et Tomizawa 1967 ; Wolf et all. 1968 ; Caro et Berg 1968 ; Helmstetter 1968 ; Cerda-Olmedo et all. 1968), dans toutes les souches étudiées (environ 50).

L'étude de deux aspects du système chez la souche B-11 l'effet de la carence en thymine, et l'effet de l'inhibition des synthèses protéiques, ont permis de conclure avec suffisamment de sécurité que B-11 possède le même type de régulation.

1) Effet de la carence en thymine

Les conséquences de la carence en thymine étudiées par différents auteurs chez la souche 15 de E. Coli ont été aussi observées chez B-11 : la carence entraine la mort des cellules, suivant une cinétique comparable à celle obtenue avec les autres souches (Fig. F1). En outre, le doublement du taux de synthèse de l'ADN dû à l'initiation prématurée d'un nouveau cycle de réplication s'observe dans des conditions similaires (Fig. F2).

2) Effet de la carence en acides aminés

Des expériences d'incorporation de thymine dans des conditions de carence en méthionine, acide aminé que B-11 ne peut fabriquer, montrent que la synthèse de l'ADN se poursuit pendant une durée correspondant à environ un temps de

génération et s'arrête alors (Fig. F3, phase A). La quantité d'ADN synthétisé dans ces conditions représente environ 40 à 50 % de la quantité initiale.

Ces résultats sont identiques à ceux qui ont été décrits par Lark pour la souche 15, et qui l'ont amené à conclure à la nécessité d'une synthèse protéique pour initier le cycle suivant.

En effet, l'addition de l'acide aminé essentiel quand les cellules ont cessé leur synthèse résiduelle d'ADN entraine une reprise, après une latence, de cette synthèse (Fig. F3, phase B + D). Nous avons aussi confirmé que la présence de thymine pendant cette phase de synthèse protéique n'est pas obligatoire (Fig. F3, phase B). Dans ces conditions, l'initiation du nouveau cycle de réplication se fait sur tous les chromosomes simultanément. Cette technique permet d'obtenir une population cellulaire dont la réplication est synchronisée (Lark et all. 1963).

L'ensemble de ces résultats, insuffisants à eux seuls pour définir le système de régulation de la réplication de B-11 permettent cependant, par leur identité avec les résultats obtenus en particulier avec la souche 15, de conclure à l'identité des mécanismes de régulation de ces souches. On peut donc penser que les autres faits établis chez 15 sont aussi applicables à B-11. En particulier on peut espérer mettre en évidence une origine et une direction de réplication fixes par rapport aux marqueurs génétiques de la souche.

II - DETERMINATION DE LA SEQUENCE DE REPLICATION DU CHROMOSOME DE B-11.

Ces résultats ne permettent pas, cependant, de conclure avec certitude que la présence du facteur sexuel n'a pas introduit un déplacement de l'origine et éventuellement un changement de direction, de la réplication végétative, au profit de

la direction et de l'origine de transfert définies par la position de F.

Jacob et all. (1963) ont proposé que la réplication contrôlée par le facteur sexuel serait réprimée, à l'état végétatif, par le réplicon chromosomique. Cette répression est levée au moment de la conjugaison : F initie alors une réplication suivant son mode à lui, tant du point de vue origine que direction.

La démonstration de l'existence de la réplication de transfert n'a pas été faite de façon définitive, bien qu'un nombre important de travaux aient été effectués (Cuzin et all. 1967).

Il semble cependant, malgré un certain nombre de réponses contradictoires, que la réplication de transfert soit une réalité. D'autres modèles proposés, tels que transfert d'un ADN simple chaîne (Cohen et all. 1968 ; Ohki et Tomizawa 1968; Vielmetter et all. 1968) qui serait ou non répliqué dans le zygote, initiation par le mâle d'une réplication effectuée par la femelle au fur et à mesure du transfert (Ohki et Tomizawa 1968; Vapnek et Rupp 1970) n'ont pas reçu de confirmation expérimentale définitive.

Le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin (1963) trouvera peut-être une confirmation dans l'observation suivante de Caro (1971) : certains mutants d'initiation chromosomique, qui sont bloqués à température non permissive à l'état de cellules F^+, continuent à synthétiser de l'ADN si ils mutent vers la forme Hfr. Cara n'a pas encore précisé de quelle façon le facteur sexuel opère ce "sauvetage" de la cellule : soit par simple levée de la répression chromosomique sur le F, soit par utilisation d'une protéine codée par F, pour remplacer son homologue défectueux chez le chromosome.

Le schéma proposé par Jacob, Brenner et Cuzin (1963) implique que, au moins dans des conditions normales, la présence du facteur sexuel n'influe pas sur le système de réplication chromosomique pendant la croissance végétative. Les expériences de localisation de l'origine de réplication végétative chez des Hfr indiquent que cette hypothèse est vérifiée au moins dans la majorité des cas.

La réplication de transfert induite par F étant admise, plusieurs problèmes restent posés :

- Que devient la réplication chromosomique quand le transfert est initié ? En effet, si l'origine et la direction de la réplication chromosomique sont uniques, il n'en est pas de même pour celles induites par F, d'une souche à l'autre. F a-t-il la capacité de bloquer la réplication végétative par une répression comparable à celle invoquée pour l'inhibition de F en l'absence de transfert ? Sinon il faut envisager des cas où deux fourches de réplication fonctionnant simultanément et dans deux directions opposées, vont devoir se croiser.

- F initie la réplication de transfert. Mais il est peu probable qu'il possède l'information nécessaire pour fabriquer les enzymes requis dans la synthèse de l'ADN. Il doit donc utiliser ceux de la cellule. On peut se demander si celle-ci en possède suffisamment d'exemplaires disponibles, ou si le facteur sexuel va déplacer ceux qui fonctionnaient sur la fourche de réplication végétative en cours. Dans cette dernière hypothèse, l'initiation de la réplication de transfert entrainerait un arrêt de la réplication végétative du même chromosome. Un problème analogue peut être posé en ce qui concerne le point d'attachement du chromosome végétatif et du chromosome "en conjugaison".

Des expériences ont été réalisées, qui ont permis de répondre aux deux questions suivantes (Espardellier-Joset et all. 1967) :

- l'influence éventuelle de F sur l'origine et la direction de la réplication végétative.

- la localisation de l'origine et la séquence de réplication par rapport à la carte génétique de B-11.

Le principe de ces expériences est le suivant : le déroulement d'un cycle de réplication est suivi par marquage de l'ADN par des impulsions de 5 Bromo-uracil (5BU) placées à différents moments du cycle chez des bactéries dont la synthèse de l'ADN est synchronisée. Les régions ainsi marquées sont séparées par leur densité, et localisées sur le chromosome par analyse des marqueurs génétiques qu'elles portent.

1) Synchronisation des cellules

Deux techniques, qui découlent des résultats décrits ci-dessus, ont été utilisées :

a) La première consiste en deux carences successives ; une carence en méthionine laisse les cellules achever le cycle de réplication en cours. Une deuxième carence en thymine permet de synthétiser la (les) protéine(s) nécessaire(s) à l'initiation du cycle suivant. Après un temps suffisant pour que toutes les cellules aient terminé cette synthèse, la réplication est déclenchée par addition de thymine ou de 5BU, suivant les expériences. Des expériences préliminaires ont permis de déterminer les durées optimales des deux carences (Fig. F3).

b) La deuxième méthode utilisée consiste à faire subir uniquement une carence en thymine à des cellules en phase exponentielle de croissance. Ce traitement déclenche l'initiation d'un cycle de réplication prématuré, simultanément dans toutes les cellules (Fig. F2). Cette réplication se déroule normalement (Pritchard, Lark 1964) pendant le premier cycle au moins : elle utilise la même origine, suit la même direction, et se fait avec la même vitesse, que la réplication normale.

Les cellules carencées en thymine vont être le siège de deux cycles de réplication simultanés : l'un, non synchronisé, correspond à la croissance exponentielle et ne nous intéresse pas ; l'autre, synchronisé, correspond au cycle prématuré et sera utilisé pour suivre la réplication.

2) Marquage de l'ADN

Ce marquage est effectué par remplacement de la thymine par le 5BU. L'ADN formé aura une densité hybride (marquage de l'une des deux chaînes) ou lourde (marquage des deux chaînes) suivant les conditions expérimentales. D'une façon générale, les durées de marquage ont été choisies telles qu'elles n'excèdent pas la durée d'un cycle normal de réplication.

La première méthode de synchronisation conduit à l'apparition d'ADN de densité hybride dans la région en cours de réplication au moment de l'impulsion (Fig. F4-A). L'utilisation d'impulsions de durées variables ou commencées à des temps variables permet de faire marquer sélectivement certaines régions et ainsi de connaître la direction de la réplication. La figure F5 donne les résultats obtenus après deux impulsions placées respectivement en début et en cours de réplication.

Après mise en oeuvre de la deuxième technique de synchronisation, l'incorporation de 5BU se fait à deux endroits sur chaque chromosome : le fonctionnement de la fourche de réplication "exponentielle" va former de l'ADN hybride réparti sur tout le chromosome, dans l'ensemble de la population. Le fonctionnement de la fourche "induite" conduit à la même situation que dans la première méthode. Mais le fait important ici est que, par suite du fonctionnement simultané des deux fourches, une superposition des deux cycles se produit dans une certaine proportion des chromosomes et conduit à la formation d'ADN marqué sur les deux chaînes (Fig. F4-B). Il est intéressant, dans ce cas, de commencer le marquage au 5BU

immédiatement après la carence. La superposition des deux cycles se produira dans la région de l'origine de réplication (Fig. F6). Du fait de la distribution alléatoire de la fourche normale sur le chromosome, et du fonctionnement parallèle des deux fourches, la quantité d'ADN à densité lourde ne sera pas répartie de façon homogène sur la région impliquée pendant la durée du marquage ; elle augmentera régulièrement à partir de l'origine de réplication, dans la direction de cette réplication et diminuera brusquement à l'endroit correspondant à la fin de l'impulsion. L'examen du profil de la courbe d'apparition d'ADN lourd peut indiquer à la fois l'origine et la direction de la réplication.

Cette technique de synchronisation permet ainsi d'avoir deux fois la même réponse dans la même expérience : par localisation de l'ADN hybride et par celle de l'ADN lourd.

3) Séparation de l'ADN par densité

Dès la fin de l'impulsion de 5BU, la synthèse de l'ADN est bloquée et les cellules sont infectées par un phage transducteur généralisé. Le phage choisi, un mutant virulent de P 1, présente deux avantages importants (Ikeda et Tomizawa 1965) : il inhibe la synthèse de l'ADN bactérien pendant son cycle de reproduction. Ceci permet d'incorporer l'ADN hôte tel qu'il se trouve au moment de l'infection. Les particules transductrices qu'il forme ont la particularité de ne contenir que de l'AD bactérien. Les différences de densités introduites dans cet ADN ne seront donc pas effacées par la présence d'ADN phagique.

Après lyse des cellules, les phages et les particules transductrices sont séparés selon leur densité dans un gradient de Chlorure de Césium, en centrifugation préparative. Ce traitement n'inactive pas leur pouvoir infectieux. Le gradient est extrait selon la technique classique des gouttes.

4) Repérage génétique des régions marquées en densit

Les échantillons recueillis sont analysés de la façon suivante : la localisation de la zone des phages infectieux sert de repère de densité. Les fréquences de transduction en fonction de la densité sont déterminées pour un certain nombre de marqueurs dont la localisation chromosomique est bien connue. La distribution de ces fréquences comparée aux temps de marquage au 5BU permet de placer l'origine de réplication végétative, et de connaître la direction de la réplication.

Les résultats obtenus après deux expériences de ce type sont donnés dans les figures F5 (synchronisation par carences successives) et F6 (synchronisation par carence en thymine).

Cette méthode, bien qu'assez simple dans son principe, comporte un nombre élevé d'étapes, ce qui a pour conséquence une certaine fluctuation dans les résultats. Ces expériences ont donc été répétées plusieurs fois. Six expériences ont ainsi été effectuées dans diverses conditions de synchronisation ou de marquage au 5BU. Malgré certaines incohérences, l'ensemble des résultats conduit à une réponse claire (tabl. F1). La région comportant le plus fort pourcentage d'ADN hybride après un marquage correspondant théoriquement à la région de l'origine (expériences 1 à 5, synchronisation par carences en méthionine puis en thymine) se situe près du marqueur Ilv. La direction de réplication suggérée par la diminution de pourcentage de DNA hybride serait de Ilv, qui serait répliqué en tête, vers Arg_B , Thr . Dans l'expérience 6, (synchronisation par carence en thymine), du DNA lourd se forme dans la région Ilv, et intéresse les marqueurs génétiques dans la direction Arg_B , Thr , en fonction de la durée du marquage. Le DNA hybride se forme en proportion plus élevée dans la région Ilv, mais il en apparaît dans tous les autres marqueurs du chromosome. Ceci indique que la transduction par le phage P 1 n'intéresse pas préférentiellement les marqueurs proches de Ilv quand ils sont marqués par du 5BU, et justifie la méthode utilisée.

La précision sur la localisation dépend des marqueurs disponibles dans la région de l'origine. Nous disposions de souches nous permettant d'étudier les marqueurs $\underline{Arg}_E$, situé à 61,5 min. sur la carte de Coli K 12 , et Ilv, à 73 min. L'utilisation de marqueurs intermédiaires, qui sont essentiellement des fermentations de sucres, s'est avérée difficile en raison de leur nature.

Ces expériences permettent de conclure que l'origine de réplication végétative de la souche B-11 se trouve entre $\underline{Arg}_E$ et Ilv , la direction de réplication étant de Ilv vers $\underline{Arg}_B$, Thr , Leu ... $\underline{Arg}_E$. La présence du facteur sexuel intégré n'a donc pas déplacé à son avantage le système végétatif, puisque les deux origines se trouvent distantes de presque la moitié de la longueur du chromosome.

Caro et Berg (1968) ont utilisé exactement le même processus expérimental que celui décrit ici, sur d'autres souches. Les résultats qu'ils ont obtenus correspondent à celui énoncé pour B-11 : quel que soit le type sexuel des cellules, l'origine de réplication végétative se trouve dans la région $\underline{Arg}_E$ - Ilv. La direction de réplication est aussi de Ilv vers Thr , Leu ... $\underline{Arg}_E$. Ces auteurs ont cependant trouvé quelques souches dont l'origine serait située dans le premier quart du chromosome, la direction n'étant pas modifiée, ceci indépendamment du sexe des souches.

En résumé, la souche B-11 ne se différencie pas du cas général observé chez Coli, tant par son mécanisme de régulation que par la localisation de son origine ou la direction de la réplication, et par l'indépendance de ces deux dernières caractéristiques par rapport à la séquence de transfert.

III - CONTROLE DE L'INVERSION DE TRANSFERT AU NIVEAU DES SYNTHESES MACROMOLECULAIRES - RESULTATS ET DISCUSSION

Les caractéristiques de la réplication normale de B-11 étant définies, il est possible de rechercher les relations éventuelles pouvant exister entre le mécanisme conduisant à l'induction de l'inversion de transfert, et l'un des niveaux de contrôle des systèmes de synthèse de l'ADN, soit végétatif soit épisomal.

L'étude de l'inversion de transfert chez B-11 a été envisagée dans l'optique de l'existence d'une réplication spécifique de transfert contrôlée par F, suivant le modèle de Jacob, Brenner et Cuzin (1963).

Le modèle proposé pour expliquer l'inversion et son instabilité suppose :

1) L'induction d'une nouvelle relation d'affinité entre un produit de F, lié à son système de réplication, et le site du chromosome qui sert de nouvelle origine de transfert. Cette induction peut être due à une modification d'un produit de F ou à une modification du site chromosomique. Cette dernière possibilité paraît plus vraisemblable pour deux raisons :

a) il est assez facile d'imaginer une modification de structure des chaînes d'ADN, telle que cassure par exemple, qui conduirait à une fixation des enzymes de réplication à cet endroit.

b) Les expériences de B. Low (1965) (voir Chap. D, § IV) ont montré, dans le cas du groupe de souches issues du F^+ W 1485, que la capacité d'inversion est une propriété du chromosome et non du F. Il en est probablement de même dans le cas de la souche B-11.

2) La disparition rapide de la cause directe de l'inversion, c'est-à-dire du produit anormal fabriqué par F ou de la modification chromosomique induite. A ce niveau aussi il apparaît plus aisé de faire disparaître une anomalie de structure que d'inactiver ou de détruire une protéine.

La recherche des mâles inversés stables parmi les survivants d'une suspension de mâles B-11 irradiée (voir Chap. E, § IV) a montré que l'inversion n'est pas génétiquement stable, c'est-à-dire transmissible aux descendants mitotiques. Ces expériences ne permettaient pas de savoir si cette inversion pouvait se transmettre par voie cytoplasmique, c'est-à-dire se trouver transmise à une ou un petit nombre de cellules à l'intérieur de chaque clone survivant. Il a aussi été montré par l'étude du type sexuel des recombinants formés immédiatement après irradiation des mâles, que l'inversion n'est pas non plus transmissible à la cellule réceptrice.

3) Détermination de la durée de vie de la capacité à transférer de façon inverse. Une première étape a donc consisté à déterminer la durée de vie de la modification dans la population irradiée. Le principe des expériences est le suivant : la suspension de mâles est irradiée à une dose convenable, donnant en général une survie de 10^{-2} à 10^{-3}, ce qui correspond à une fréquence d'inversion suffisamment élevée (Fig.E6 La suspension est alors incubée à 37°C. Des croisements sont effectués en fonction du temps d'incubation. La croissance des cellules est suivie parallèlement. La reproductibilité des résultats s'est avérée médiocre, probablement parce que l'irradiation peut induire une latence dans la reprise des métabolismes cellulaires, dont la durée est variable d'une expérience à l'autre. L'allure de la courbe de croissance montre soit une latence, soit une augmentation immédiate, soit même une mortalité supplémentaire au début de l'incubation.

La détermination des gradients de transfert indique que l'inversion disparaît progressivement au profit de la séquence normale d'injection, et n'est plus décelable au moment où le nombre de cellules viables a environ doublé dans la population (Fig. F7). Le tableau F2, qui résume les résultats des expériences effectuées, fait apparaître nettement la manière suivant laquelle se présente le retour à la séquence normale de transfert : il est mesuré par l'évolution des rapports des nombres de recombinants $\underline{His}^{+}\underline{Str}^{r}$ ou $\underline{Leu}^{+}\underline{Str}^{r}$ à $\underline{Trp}^{+}\underline{Str}^{r}$. Cette évolution est due à une augmentation des nombres de recombinants $\underline{Trp}^{+}\underline{Str}^{r}$ et $\underline{His}^{+}\underline{Str}^{r}$. Le nombre de recombinants $\underline{Leu}^{+}\underline{Str}^{r}$ obtenus n'est pas modifié par l'incubation des cellules mâles, dans les limites de temps utilisées ici. La signification probable de cette observation est la suivante : on sait que la grosse majorité des cellules mâles participe effectivement à la conjugaison , qu'elles aient été préalablement irradiées ou non (Voir Chap. C). En outre, on sait que les cellules tuées continuent à métaboliser à un taux relativement élevé pendant les premières heures qui suivent l'irradiation, et en particulier à répliquer leur ADN. Si la presque totalité des cellules effectue une réplication, le nombre de chromosome, et probablement de possibilités de transfert, double à peu près, sans division apparente des cellules. Si l'on fait l'hypothèse, proposée plus haut, que les chromosomes nouvellement répliqués ont perdu, par cette réplication, leur propriété de transfert inverse, on est alors en présence d'une population double de celle de départ et qui du point de vue du transfert est équivalente à une même population non irradiée, c'est-à-dire transférant suivant la séquence et la fréquence normales.

Cette explication rend compte de la rapide modification de la forme du gradient de transfert, et de l'augmentation importante en valeurs absolues, des quantités de recombinants $\underline{Trp}^{+}\underline{Str}^{r}$ et $\underline{His}^{+}\underline{Str}^{r}$. L'augmentation corrélative des recombinants $\underline{Leu}^{+}\underline{Str}^{r}$ due à ce nouveau transfert, est masquée par la

présence des recombinants Leu$^+$ Str^r issus du transfert inverse. Au point de vue de la stabilité de l'inversion induite, ces expériences permettent de tirer la conclusion suivante : l'inversion n'est pas transmissible héréditairement, ceci dès la première duplication du matériel génétique. Elles ne permettent pas de savoir si l'inversion disparaît en même temps dans la cellule irradiée elle-même, ou si elle se maintient au moins dans cette dernière et/ou dans l'une de ses cellules filles, et ne disparaîtrait alors que par dilution.

Des expériences permettant d'éprouver l'explication ci-dessus sont actuellement en cours. Elles consistent en particulier à vérifier les capacités de synthèses des cellules irradiées et incubées dans les conditions décrites.

4) Discussion

Un moyen d'approche plus précis du problème consiste à chercher les conditions qui permettent le maintien de l'inversion par l'étude de l'influence d'inhibiteurs de certains types de synthèses à divers moments. D'après les résultats de quelques expériences préliminaires, il semble que l'inhibition des synthèses protéiques après irradiation conduise au maintien de l'inversion au moins pendant la durée du traitement. Dans ces conditions, la synthèse de l'ADN continue pendant un temps équivalent à un temps de génération, chaque cycle de réplication en cours continuant jusqu'à complétion.

Pour déterminer le rôle éventuel du système de réplication du facteur sexuel dans l'inversion de transfert, et peut être dans le processus normal de transfert, il sera souhaitable d'étudier l'effet de mutations concernant les principales fonctions connues de F. Il n'est pas non plus exclu que du côté chromosomique la capacité à produire l'inversion soit la conséquence d'un caractère génétique, et non uniquement de l'existence d'une propriété physique (cassure radioinduite) ou

chimique (séquence particulière de bases) de la région de l'origine induite.

On sait que la carence en thymine d'une souche déficiente pour la synthèse de cette base entraîne des perturbations importantes, dont trois en tous cas nous intéressent ici

- le déclenchement d'un cycle de réplication prématuré, donc non soumis au système normal de régulation de ce processus (Maaloe et Hanawalt 1961) ;

- la mort des cellules (Barner Cohen 1956).

- l'induction du développement végétatif de certains épisomes présents dans le génôme bactérien, tels que prophage (Korn et Weissbach 1962), ou facteurs colicinogènes (Sicard et Devorét 1962). Ce phénomène nous intéresse particulièrement, car il peut aussi être provoqué par les radiations.

L'induction de l'inversion de transfert présente quelques analogies avec l'induction du prophage, son efficacité, sa précision, la levée de l'état réprimé du système de réplication de l'épisome. On peut alors se demander jusqu'où va cette analogie. Les inducteurs phagiques seront-ils tous des inducteurs de l'inversion de transfert ? Existe-il un répresseur du F comme il existe un répresseur des prophages ? Si oui, quelle est la fonction du site activé par l'induction ?

ooo ooo

ooo

FIGURE F 1

EFFET DE LA CARENCE EN THYMINE

COURBE DE SURVIE DES CELLULES

Une suspension de B-11 Thy$^-$ en phase exponentielle de croissance (2. 10^8 cell./ml) en milieu E complet est filtrée et suspendue dans le même volume de milieu dépourvu de thymine. La suspension est incubée à 37°C. Des prélèvements sont effectués en fonction du temps d'incubation, pour mesurer le nombre de cellules viables, par étalement sur milieu gélosé complet.

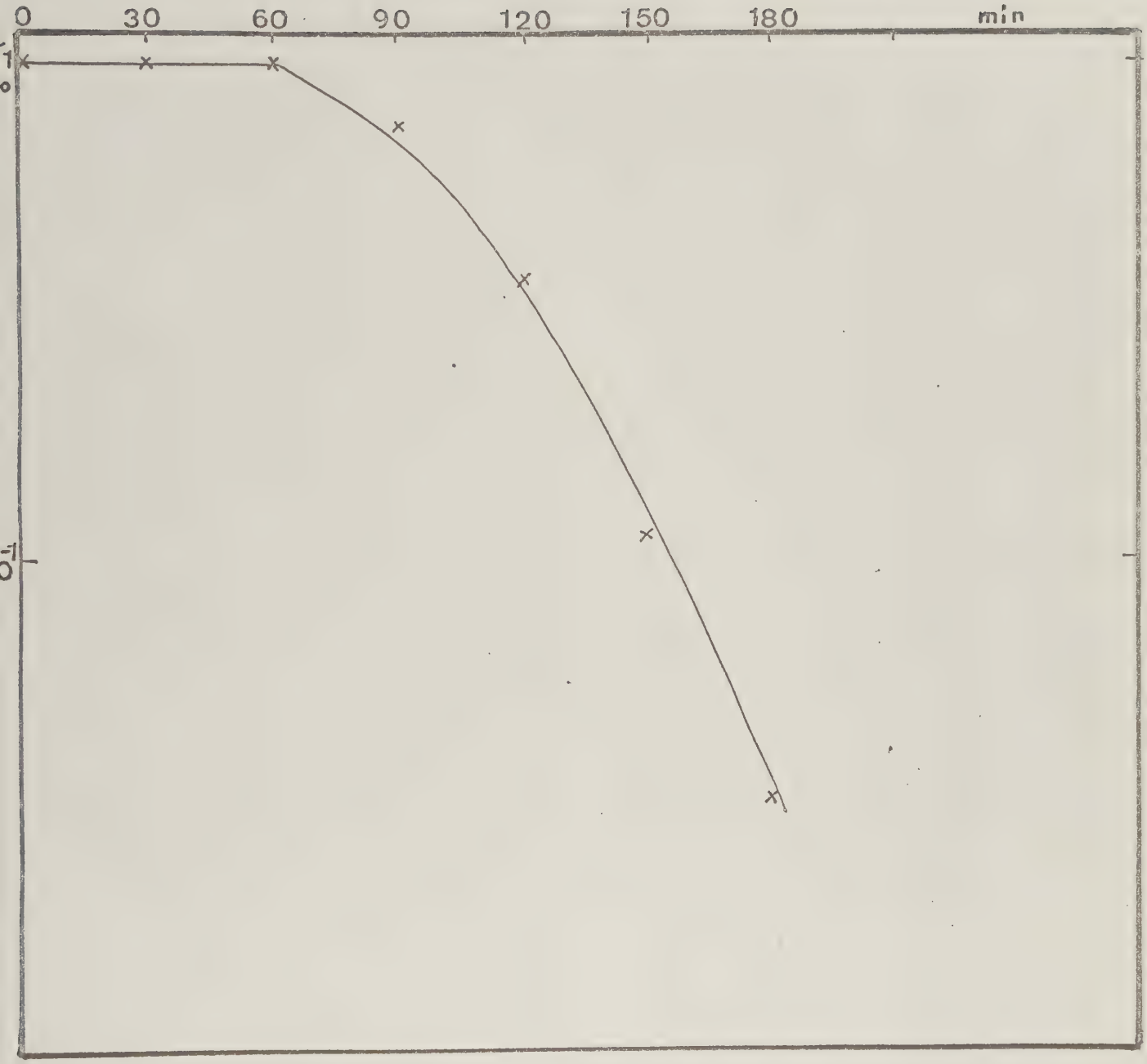


Fig F1

FIGURE F 2

EFFET DE LA CARENCE EN THYMINE

TAUX DE SYNTHESE DE L'ADN APRES CARENCE

Une suspension de B-11 Thy$^-$ est traitée comme dans la figure F1. A divers temps de la carence (0, 30, 60, 90min) une fraction est prélevée et incubée à 37°C en présence de thymine (2 γ/ml) et de thymine radioactive (Thy-^{3}H ; 0,1 µC/m Des échantillons de 1ml prélevés dans chacune de ces fraction en fonction du temps de marquage sont mis en présence de TCA (5 % final) à 0°C, puis rincés avec du TCA à 0,5 % à 0°C, pui avec de l'alcool à 95°, à 0°C. Les filtres sont séchés et pla cés dans des flacons contenant un mélange scintillant, pour mesurer la radioactivité incorporée dans l'ADN. Le comptage est effectué sur un compteur Packard.

cpm/ml
4.10⁴
3.10⁴
2.10⁴
10⁴
Non carencé
30 min carence
60 min carence
90 min carence

FIGURE F 3

EFFET DE LA CARENCE EN METHIONINE SUR LA SYNTHESE DE L'ADN

A - Une culture de B-11 Thy$^-$ en phase exponentielle de croissance en milieu E complet (2.10^8 cell./ml) est filtrée et suspendue dans le même volume de milieu E sans méthionine et contenant de la thymine (2 γ/ml) et de la thymine -^{3}H (0,1 µC/ml). Des échantillons sont prélevés en fonction du temps. La thymine radioactive incorporée dans l'ADN est mesurée selon la méthode décrite pour la figure F 2.

B - Après 100 min. de carence, la moitié de la suspension est filtrée et suspendue dans le même volume de milieu dépourvu de thymine et contenant 30 γ/ml de méthionine.

C - Après 30 min. de carence, on ajoute de la thymine (2 γ/ml) et de la thymine-3H (0,1 µC/ml) et on suit l'incorporation de Thy-3H dans l'ADN en fonction du temps.

C'- Après 100 min. de carence en méthionine, la deuxième moitié de la suspension reçoit immédiatement la méthionine (30 γ/ml). On suit l'incorporation de Thy-3H dans l'ADN.

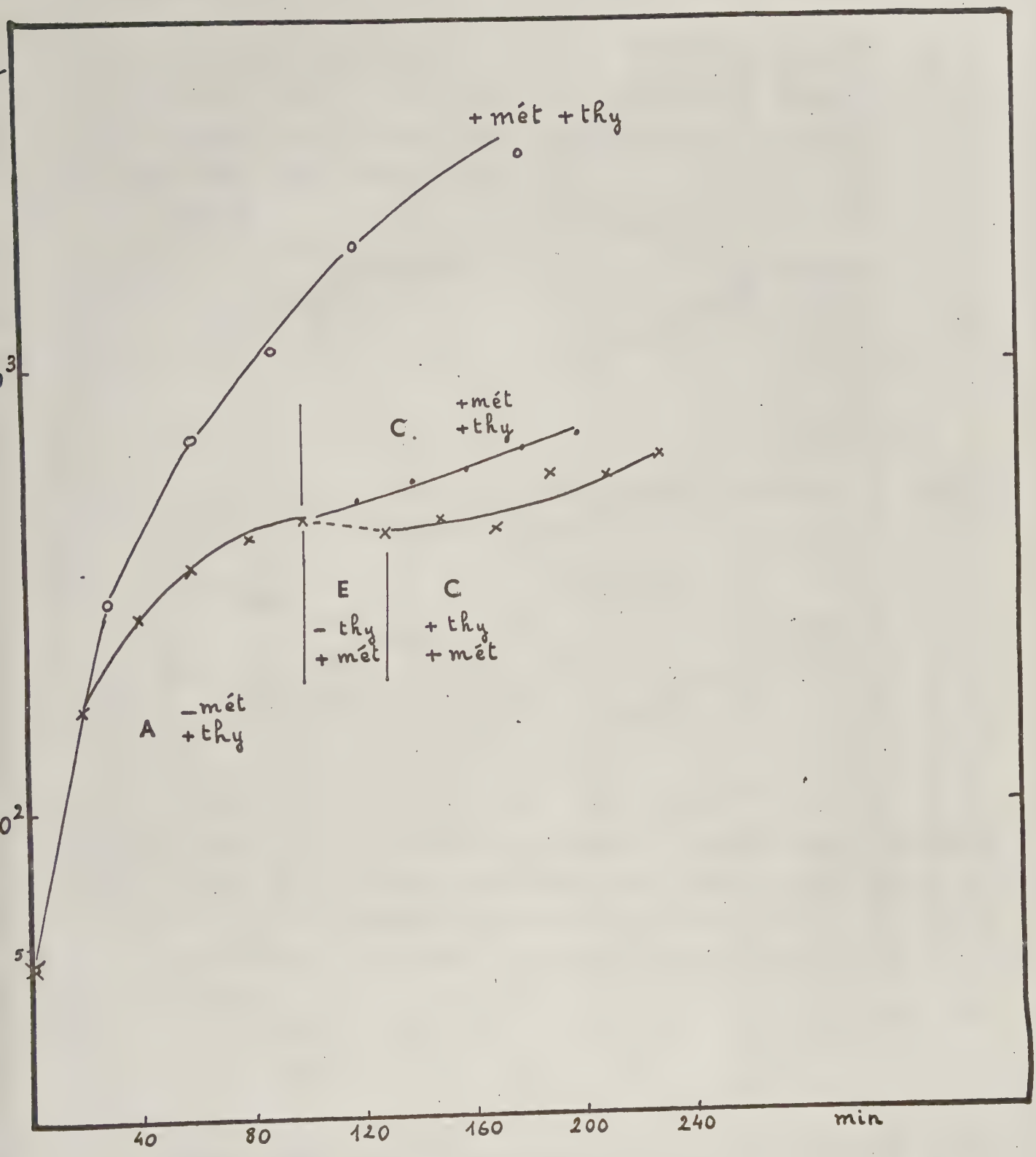
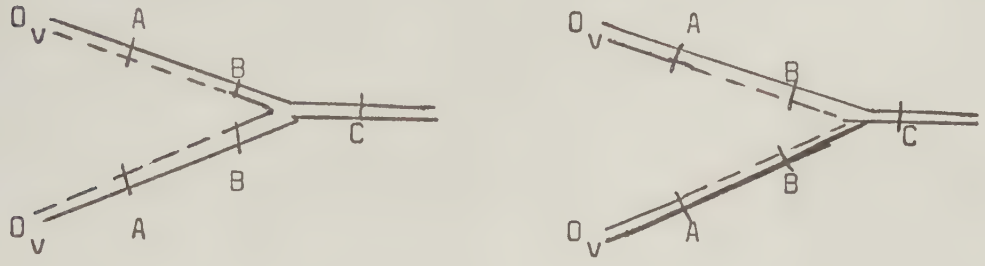

+ mét + thy
C
+mét
+thy
E
- thy
+ mét
C
+ thy
+ mét
A
-mét
+thy
10^3
10^2
5
40
80
120
160
200
240
min

Fig 3

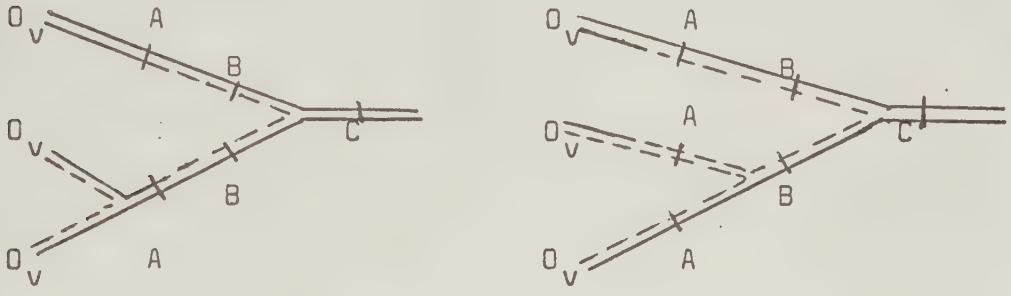
FIGURE F 4

SCHEMA D'INCORPORATION DU 5-BU DANS UNE SUSPENSION SYNCHRONISEE

A. Synchronisation par carence successives en méthionine et en thymine. Addition du 5-BU en début (1) et en cours (2) du cycle de réplication synchrone.



B. Synchronisation par carence en thymine. Addition du 5-BU en début de cycle de réplication.



(1) Formation d'ADN hybride, en deux régions du chromosome: à partir de l'origine végétative (O_v) (cycle induit prématurément) et au hasard (réplication exponentielle). Pas de superposition des régions répliquées par les 2 fourches pendant le marquage au 5-BU.

(2) Formation d'ADN lourd et hybride. L'ADN lourd est formé près de l'origine végétative.

——— ADN non marqué (thymine) ———ADN marqué (5-BU)

═══ ADN de densité légère ll

═══ ADN de densité hybride lL

═══ ADN de densité lourde LL

A, B, C marqueurs chromosomaux

FIGURE F 5

LOCALISATION DE L'ORIGINE DE REPLICATION VEGETATIVE DE B-11

SYNCHRONISATION DES CELLULES PAR CARENCES SUCCESSIVES EN METHIONINE ET EN THYMINE

Synchronisation et marquage de l'ADN - Une suspension de B-11 Thy⁻ à 2.10^8 cell./ml, en phase exponentielle de croissance en milieu E complet est filtrée, suspendue dans le même volume de milieu dépourvu de méthionine, et incubée 90 min. à 37°C. La suspension est alors filtrée, suspendue dans le même volume de milieu dépourvu de thymine et incubée à 37°C pendant 60 min. L'évolution du taux de synthèse de l'ADN est suivie sur une suspension parallèle, dans laquelle on met de la thymine radioactive (voir Fig. F3).

Les milieux de suspension sont préincubés à 37°C, de façon à réduire au maximum les latences.

La suspension est alors divisée en deux fractions :

1) On ajoute dans la première fraction du 5BU (2 γ/ml). On incube 12 min. à 37°C. La suspension est ensuite placée à 0°C après addition de KCN (2.10^{-3}M) et de thymine (20 γ/ml).

2) Dans la deuxième fraction, on ajoute de la thymine (2 γ/ml) pendant 10 min. La suspension est filtrée, suspendue en milieu + méthionine (30 γ/ml) et + 5BU (2 γ/ml), et incubée pendant 12 min. à 37°C. Elle est alors placée à 0°C, après addition de KCN 2.10^{-3}M et de thymine (20 γ/ml).

Préparation des particules transductrices - Les cellules sont lavées par centrifugation, et suspendue en milieu E complet + KCN 2.10^{-3}M et Ca^{++} $2,5.10^{-3}$M . On ajoute les phages P1kc à une multiplicité de 3 phages par bactérie. Après 30 min. d'adsorption, les suspensions sont lavées, remises en milieu E complet et incubées 90 min. à 37°C. Après lyse des cellules (addition éventuelle de chloroforme), les phages libérés sont lavés. Ils sont placés en chlorure de Césium (densité moyenne, 1,740) et centrifugés 20 h. à 23.000 tours/min. Les gradients sont extraits par le fond du tube, en environ 60 fractions.

Détermination des gènes transduits - On titre alors dans chaque fraction :

- les phages infectieux, qui donnent le repère de densité.
- les particules transductrices pour divers marqueurs, par infection de souches réceptrices adéquates. Dans les cas ou plusieurs souches réceptrices ont été utilisées, elles possédaient toutes un marqueur commun servant de référence.

Les résultats sont calculés en pourcentages de particules transductrices de densités hybride ou légère par ml, par rapport à la quantité totale de particules transduisant le marqueur étudié.

1l - emplacement des particules portant de l'ADN léger.
1L - emplacement des particules portant de l'ADN hybride.
.——.marquage au 5BU de 0 à 12 min.du cycle de réplication.
x---xmarquage au 5BU de 11 à 22min.du cycle de réplication.

- Les chiffres placés à côté des noms des marqueurs indiquent leur position sur la carte du chromosome de Coli.
- L'expérience décrite ici correspond aux expériences n° 1 et 5 du tableau F 1.

Figure F 5

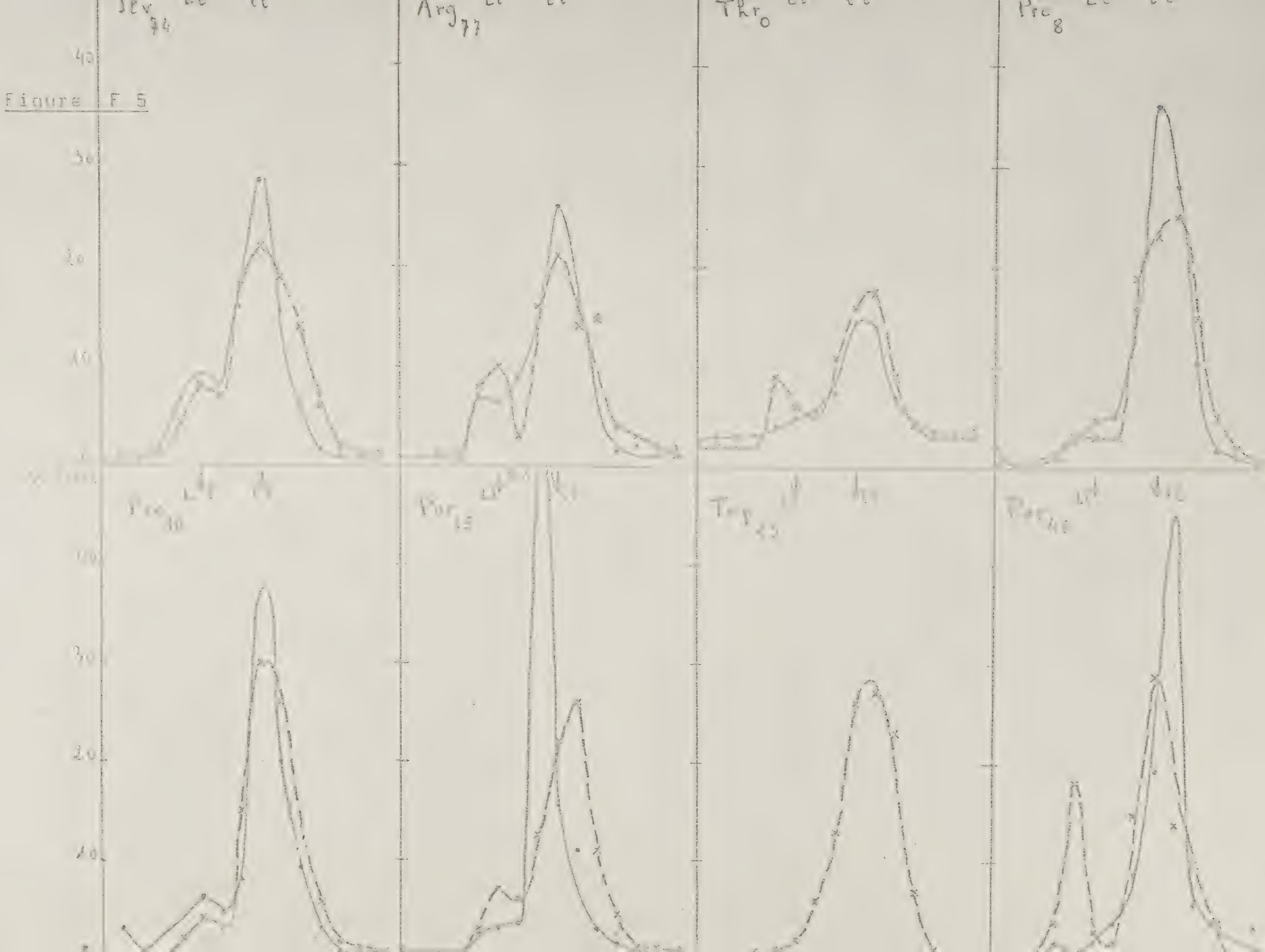


FIGURE F 6

LOCALISATION DE L'ORIGINE VEGETATIVE DE B-11
SYNCHRONISATION PAR CARENCE EN THYMINE

Synchronisation et marquage de l'ADN

Une suspension de B-11 Thy⁻ en phase exponentielle de croissance en milieu E complet est filtrée, suspendue en milieu E + méthionine et incubée à 37°C pendant 60 min. Ce temps a été choisi d'après les résultats obtenus précédemment (voir Fig. F 2). Du 5BU (2 γ/ml) est ajouté.

La moitié de la suspension est prélevée après 15 min. de marquage, et additionnée de KCN 2.10^{-3} M et de thymine (20 γ/ml).

La deuxième moitié est traitée de la même façon après 25 min. de marquage.

Préparation des particules transductrices.

La suite de l'expérience est identique à celle de la figure F5.

Les résultats sont calculés en pourcentages de particules transductrices de densités lourde, hybride et légère par ml par rapport à la quantité totale de particules transduisant le marqueur étudié.

ll emplacement des particules portant de l'ADN léger.
iL emplacement des particules portant de l'ADN hybride.
LL emplacement des particules portant de l'ADN lourd.
.____. Marquage au 5BU de 0 à 15 min. du cycle de réplication.
x----x Marquage au 5BU de 0 à 25 min. du cycle de réplication.

Les chiffres placés à côté des noms des marqueurs indiquent leur position sur la carte du chromosome de Coli.

L'expérience décrite ici correspond à l'expérience n° 6 dans le tableau F 1.

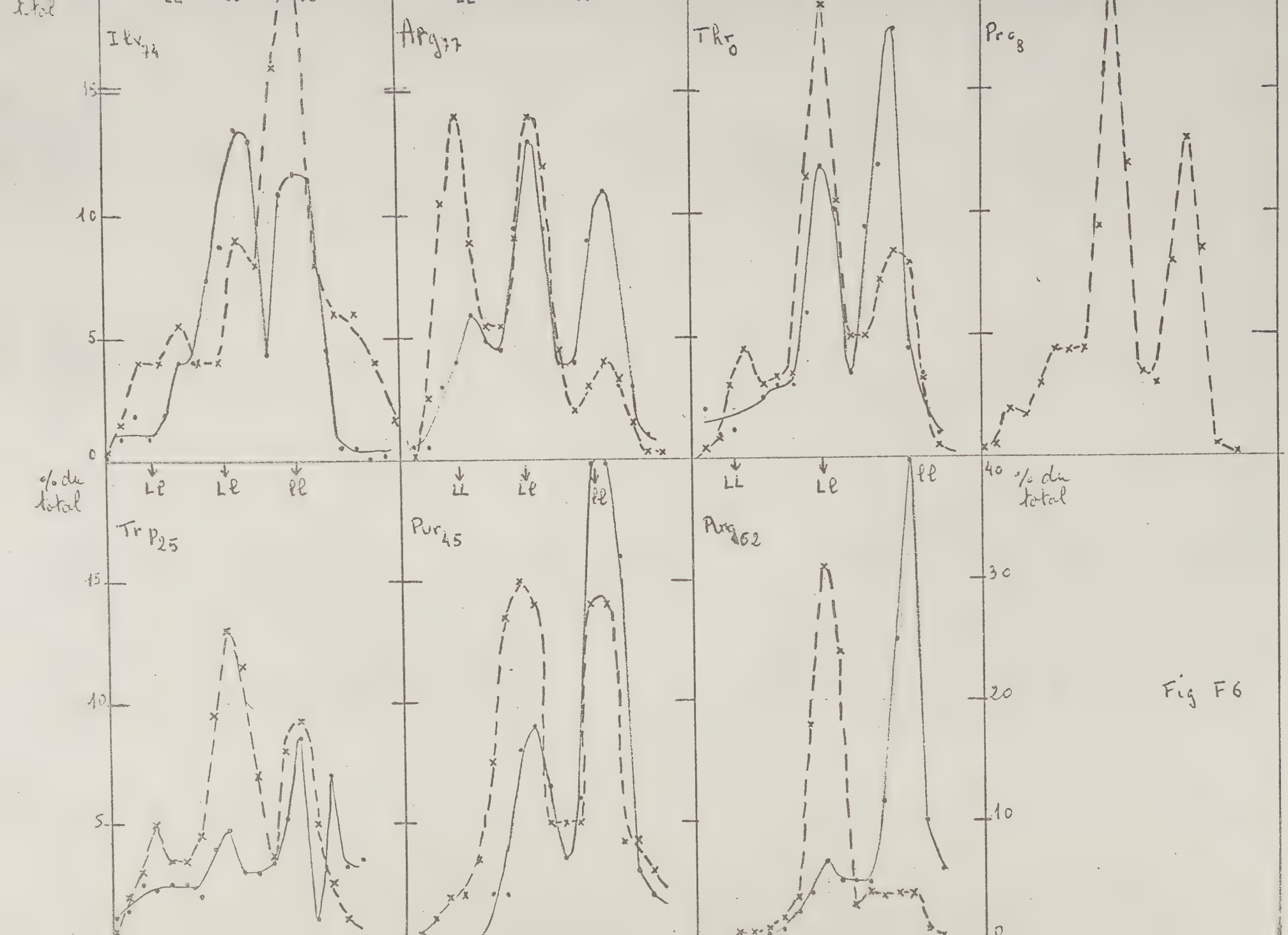


Fig F6

FIGURE F 7

INFLUENCE DE L'INCUBATION A 37°C APRES IRRADIATION SUR LA SEQUENCE DE TRANSFERT DE B-11

Une suspension de B-11 en phase exponentielle de croissance à 2.10^8 cell./ml est irradiée aux rayons γ, à une dose de 70 kr donnant une survie de $4,5.10^{-3}$. La suspension est alors incubée dans le milieu d'irradiation. Des prélèvements sont effectués en fonction du temps d'incubation pour mesurer :

- la division des cellules, par étalements sur milieu complet gélosé.
- la fréquence de transmission des marqueurs Trp, His et Leu, par étalements sur les milieux appropriés.

A - Courbe de croissance.

B - Variation du gradient de transfert. Chaque courbe représente le gradient obtenu après un croisement de 90 min., commencé aux temps indiqués à gauche des courbes. La dernière courbe à droite donne le gradient de la suspension non irradiée. Les valeurs numériques sont les quantités absolues de recombinants obtenues. Aucune correction n'a été faite pour tenir compte de la croissance des cellules viables, car elles représentent une fraction négligeable de la population totale.

• $\underline{Trp}^+ \underline{Str}^r$ x $\underline{His}^+ \underline{Str}^r$ o $\underline{Leu}^+ \underline{Str}^r$

C - "Croissance" des marqueurs. Ces courbes donnent le facteur d'augmentation, en fonction du temps, de la quantité de chaque marqueur obtenue, par rapport au début de l'incubation.

En ordonnées figure le rapport :

$$\frac{\text{Nombre de recombinants } M^+ \text{ au temps indiqué}}{\text{Nombre de recombinants } M^+ \text{ au temps 0}} .$$

D - Mesure de la variation du degré d'inversion en fonction du temps. Les valeurs données représentent les rapports des quantités de recombinants à chaque temps :

$$\frac{\underline{His}^+ \underline{Str}^r}{\underline{Trp}^+ \underline{Str}^r} \quad \text{ou} \quad \frac{\underline{Leu}^+ \underline{Str}^r}{\underline{Trp}^+ \underline{Str}^r}$$

Les droites horizontales en pointillés donnent les valeurs de ces rapports obtenues dans le témoin non irradié.

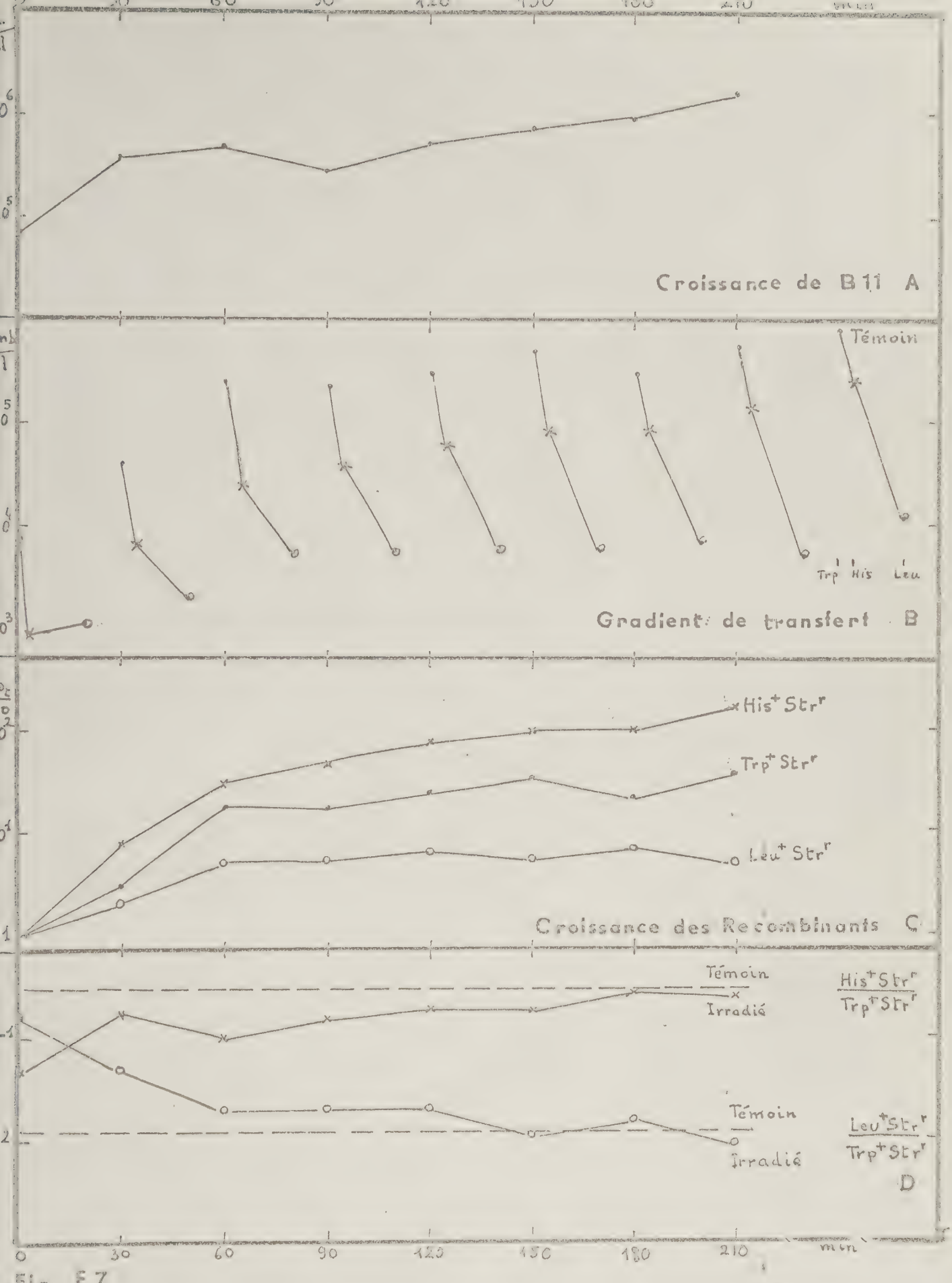

Croissance de B 11 A
Témoin
Trp
His
Leu
Gradient de transfert B
His+ Str^r
Trp+ Str^r
Leu+ Str^r
Croissance des Recombinants C
Témoin
Irradié
His+Str^r / Trp+Str^r
Témoin
Irradié
Leu+Str^r / Trp+Str^r
D
0
30
60
90
120
150
180
210
min

Fig F 7

FIGURE E 8

Structure de la région d'insertion de ^{F} dans le chromosome de ^{B}-11

Cellule végétative

Cellule induite à transférer

Transfert normal

Transfert inverse

TABLEAU F 1

POURCENTAGES DE PHAGES TRANSDUCTEURS A DENSITES HYDRIDE OU LOURDE FORMES A PARTIR DE B-11 MARQUE AU 5BU PENDANT DES TEMPS VARIABLES

Expériences n° 1 à 5 :

Synchronisation des cellules par carences successives en méthionine et en thymine.

Expérience n° 6 :

Synchronisation des cellules par carence en thymine.

Les valeurs données représentent pour chaque marqueu le pourcentage de particules transductrices de densité donnée dans la population totale de particules transduisant le marqueur considéré.

Les marqueurs sont donnés dans leur ordre sur la carte génétique de E. Coli.

Les distances, en minutes de transfert entre deux marqueurs consécutifs, ont été vérifiées, sauf pour Arg_E , et correspondent à celles données par Taylor et Trotter (1967).

TABLEAU F 1

Expérience n°		1	2	3	4	5	6			
Moment du contact avec le 5-BU		0 à 12 min	0 à 25	0 à 25	0 à 40	11 à 22	0 à 15		0 à 25	
Région du chromo. en cours de réplication, depuis O_V		O_V à 24 min	O_V à 50	O_V à 50	O_V à 80	22 à 44	O_V à 30		O_V à 5	
Marqueurs génétiques	Distances						Hybride	Lourd	Hybride	Lo
Ilv	5	21	—	22,4	67	16	60	12	42	1
Arg_B	11	9	40	14	58	21	55	20	40	4
Thr	8	—	—	—	30	13	40	-	54	1
Pro_B	3	2	—	21,3	15	8	-	0	53	1
Pro_C	0,5	6	—	—	—	8	-	-	-	
Pur_E	13	4	—	—	17	13	-	-	-	
Trp	20	—	15	16,6	—	3	45	0	40	1
Pur_C	17	9	—	—	29	25	30	0	50	
Arg_E	11,5	—	15	5,3	—	-	10	0	80	
Ilv										

TABLEAU F 2

VARIATION DE LA SEQUENCE DE TRANSFERT EN FONCTION DE L'INCUBATION APRES IRRADIATION

L'inversion est mesurée par le rapport des quantités de recombinants His$^+$ Str^r et Leu$^+$ Str^r aux recombinants Trp$^+$ Str^r.

Ces rapports sont donnés :

- dans la suspension non irradiée.

- dans la suspension irradiée, immédiatement après irradiation.

- dans la suspension irradiée, après le temps d'incubation minimum qui a permis de retrouver des valeurs de rapports identiques à celles du témoin. Le nombre de générations, mesuré par numération des cellules viables par étalement sur milieu complet gélosé, est indiqué.

Les trois dernières colonnes donnent le facteur d'augmentation des quantités de recombinants de chacun des trois types dénombrés au moment où le gradient de transfert apparaît normal, par rapport aux valeurs obtenues au temps 0 de l'incubation.

TABLEAU F 2

Survie des ♂	Témoin	Leu$^+$Str^r/Trp$^+$Str^r Temps 0 après irrad.	Après incubation Temps	Nb dbtes	Leu$^+$/Trp$^+$	Témoin	His$^+$Str^r/Trp$^+$Str^r Temps 0 après irrad.	Après incubation Temps	Nb dbtes	His$^+$/Trp+	Facteur d'augmentation des titres en recomb. Trp$^+$Str^r	His$^+$Str^r	Leu$^+$Str^r
4.10^{-2}	$3,5.10^{-2}$	4.10^{-1}	180	2	5.10^{-2}	4.10^{-1}	$2,8.10^{-1}$	180	2	2.10^{-1}	18	12	2
2.10^{-2}	$3,7.10^{-2}$	3.10^{-2}	160	3 (1?)	10^{-2}	5.10^{-1}	2.10^{-2}	160	3 (1?)	4.10^{-1}	4	30	1
$4,5.10^{-3}$	$1,3.10^{-2}$	$1,6.10^{-1}$	180	1 ou 3,5	$1,5.10^{-2}$	3.10^{-1}	5.10^{-2}	180	1 ou 3,5	3.10^{-1}	30	100	7
$1,6.10^{-4}$	4.10^{-3}	7.10^{-2}	240	5	6.10^{-3}	2.10^{-1}	6.10^{-2}	240	5	$1,5.10^{-1}$	10	25	1
$1,5.10^{-2}$	2.10^{-3}	8.10^{-3}	200		8.10^{-3}	$1,5.10^{-1}$	4.10^{-2}	160	2	$1,5.10^{-1}$	4,5	7,5	3
1.10^{-2}	$8,5.10^{-3}$	3.10^{-2}	200		3.10^{-3}	2.10^{-1}	1.10^{-1}	160	1,8	$1,8.10^{-1}$	1	3	1

* Cette expérience est décrite en détails dans la figure F7.

C H A P I T R E G

ESSAI D'INTERPRETATION DE L'EFFET DES ULTRAVIOLETS SUR LA CONJUGAISON AU NIVEAU MOLECULAIRE

Un grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de l'effet du rayonnement UV sur l'ADN, aux mécanismes de réparation des lésions produites et aux perturbations provoquées dans le déroulement normal de la réplication et de la conjugaison.

Il nous a semblé intéressant d'analyser les résultats concernant la perturbation de la réplication et la réparation des lésions en orientant cette analyse vers l'étude des modifications induites par ce rayonnement aux diverses étapes de la conjugaison.

I - MODIFICATION DES PROCESSUS DE SYNTHESE DE L'ADN PAR INTRODUCTION DE LESIONS UV.

Les dimères de bases pyrimidiques sont formés par les UV essentiellement sur des bases adjacentes. Les distorsions des chaînes qui s'ensuivent gènent le fonctionnement normal des enzymes de réplication. Il est probable que la DNA polymérase ne sait plus apparier les molécules d'adénine qui devraient normalement venir former la chaîne complémentaire. Trois possibilités peuvent alors être envisagées : y a-t-il arrêt complet de la synthèse au-delà du dimère, ou discontinuité dans la synthèse, ou la polymérase continue-t-elle en formant une boucle pour rejoindre un peu plus loin la matrice irradiée ? La double hélice ainsi formée aurait une certaine chance d'être stable ; mais de toutes façons la chaîne néoformée ne pourra plus être une matrice correcte à la réplication suivante.

Rupp et Howard-Flanders (1968) ont étudié l'ADN synthétisé après irradiation UV par une cellule incapable de réparer les lésions par le processus d'excision. L'ADN est retrouvé après hydrolyse alcaline sous forme de fragments de faibles dimensions, correspondant aux distances moyennes séparant les dimères induits ; 60 min. d'incubation sont nécessaires pour que cet ADN retrouve à peu près la même taille que dans le témoin. Ces expériences sont en faveur de l'hypothèse suivant laquelle la polymérase ne copie pas les dimères, et laisse un trou, de dimension non connue, à leur place.

II - REPARATION DES LESIONS

La cellule possède plusieurs systèmes qui lui permettent de réparer les lésions produites, laissant alors la réplication avoir lieu normalement.

1) L'existence d'une synthèse d'ADN consécutive à l'irradiation, différant de la synthèse normale par le fait qu'elle a lieu en un grand nombre de points à la fois sur le chromosome et n'est pas soumise au système de régulation de la réplication, a été reconnue depuis assez longtemps (Billen et all. 1967). On en connait actuellement la raison (Setlow et Carrier 1964) : un système de réparation par excision des régions lésées permet d'enlever des segments de chaîne monocaténaire. Les trous formés sont alors remplis par une synthèse d'ADN dite de réparation, qui prend pour matrice la chaîne non lésée (Billen et all. 1967). On connaît la localisation chromosomique des gènes impliqués dans l'excision elle-même (Van de Putte et all. 1965), les fonctions "uvr", mais pas les enzymes responsables.

L'analyse des travaux effectués par un grand nombre d'auteurs sur le fonctionnement du système uvr suggère que des deux étapes conduisant à la réparation, la première, l'excision serait très rapide, la deuxième exigeant un temps beaucoup plus

long, de l'ordre du temps de génération de la cellule. Ce point qui est plus suggéré que démontré, est important dans le modèle que nous proposons ci-dessous, pour expliquer certains résultats.

2) La photorestauration est un mécanisme de réparation direct, spécifique des dimérisations formées par les UV. Elle consiste en une monomérisation enzymatique in situ, qui rend à l'ADN sa structure antérieure. L'enzyme responsable a été isolé par Rupert (1960). Son fonctionnement exige l'utilisation de photons, le rendement maximum correspondant à une région de longueurs d'onde située à la limite de la lumière visible (Jagger et Latarjet 1956). Ce mécanisme de réparation ne fonctionne donc que dans des conditions d'éclairement assez strictes. Il est en général rendu inopérant par maintien des cellules dans une obscurité relative après l'irradiation.

3) Il existe un troisième système de réparation, le seul qui puisse fonctionner après réplication de l'ADN. Son mécanisme en est mal connu. On sait seulement qu'il est contrôlé par le système de recombinaison bactérien. Il fonctionne sur les lésions qui n'ont pas été réparées par l'un des deux systèmes précédents, et qui n'ont malgré tout pas empêché la réplication.

Le mécanisme le plus précis a été proposé par Howard-Flanders et coll. (1968) : après réplication, les doubles hélices sont formées d'une chaîne ancienne portant des lésions (dimères)et d'une chaine nouvelle discontinue, les trous se trouvant en face des lésions. Cette structure n'est évidemment pas réparable par excision. Les auteurs suggèrent alors que des échanges de matériel se produiraient entre deux doubles hélices. Les points d'initiation des échanges seraient soit les extrémités libres des trous, soit les lésions. Les deux doubles hélices formées posséderaient alors des régions simple chaîne, déplacées par rapport aux trous

précédents, ou des régions à trois chaines. Les processus ultérieurs de synthèse dans les régions simple chaine et la digestion de l'une des chaines dans les régions à trois chaines seraient identiques à ceux d'une recombinaison normale. Le système rec serait impliqué à ce niveau.

Un argument en faveur de cette hypothèse est qu'il a été constaté depuis longtemps, chez un nombre important d'organismes, que l'introduction de lésions de structures dans l'ADN, par exemple par irradiation UV, entraîne une augmentation des fréquences de recombinaison.

4) Ces systèmes de réparation ne fonctionnent pas tous avec la même efficacité ni avec la même précision. Le système d'excision uvr a un bon rendement, et conduit rarement à des erreurs. Par contre le fonctionnement du système de recombinaison est quantitativement moins important (Howard-Flanders 1968), et est beaucoup plus mutagène (Howard-Flanders et Boyce 1966).

Le degré de sensibilité des cellules aux UV dépend du taux de fonctionnement de chacun de ces systèmes. Les effets des systèmes uvr et rec sont additifs, le non fonctionnement des deux entrainant une très forte sensibilité aux UV.

III - MODELE POSSIBLE D'EFFET DES UV SUR LA CONJUGAISON

Ce modèle résulte de l'analyse, en fonction des données précédentes, de plusieurs articles qui étudient l'effet de conditions déterminées sur l'action des UV sur la conjugaison : incubation du mâle après irradiation permettant la réparation avant le transfert ; incapacité de réparer par excision (souches uvr^-) du mâle ou de la femelle, affectant le transfert ou l'intégration.

Ce modèle suppose l'existence d'une réplication spécifique du transfert initiée par le facteur sexuel. Il ne définit pas les conditions de cette réplication, en particulier son origine ou sa direction.

Le sort des dimères formés par les UV le long des chaînes d'ADN, et la façon dont ils s'opposent au processus normal de conjugaison, dépendent de la forme allélique des gènes contrôlant les réparations, essentiellement des gènes uvr permettant la réparation par excision.

1) Irradiation du mâle avant le transfert

a) Un mâle uvr^-, qui ne sait pas exciser, va laisser passer les dimères dans la femelle. Ceux-ci, alors, ne seront plus sous une forme réparable par le système uvr de la femelle, car la réplication de transfert aura placé en face soit une séquence fausse, soit une discontinuité. Il s'ensuivra donc une modification de la fréquence normale de transmission, par augmentation du nombre des crossing-over et intégration préférentielle du matériel de la femelle.

Ceci a effectivement été observé par Wilkins et Howard-Flanders (1968). L'augmentation du nombre de crossing-over est identique, que l'allèle uvr porté par la F^- soit fonctionnel ou non.

La preuve que le dimère est effectivement transféré a été obtenue par Howard-Flanders et all. (1968) : il est possible de photorestaurer par illumination du zygote immédiatement après transfert, un gène Lac$^+$ irradié dans le mâle F'Lac$^+$ avant le croisement.

L'expérience directe d'irradiation d'un mâle uvr^- et de mesure des fréquences de transmission, identique à celles que nous avons effectuées sur Hfr H uvr^+, n'a jamais été publiée. On peut se demander si on observerait alors aussi un gradient de sensibilité des marqueurs correspondant à leur séquence de transfert. Une réponse positive supposerait qu'il existe une polarité d'intégration, à orientation identique à celle du transfert. Cette polarité a été proposée par Curtiss et Chamarella (1966) : ils imaginent que dès son entrée dans

le zygote, le matériel mâle est apparié à celui de la femelle, et que la continuation du transfert est due non à une fonction du facteur sexuel chez le mâle, mais à l'appariement progressi du chromosome mâle à celui de la femelle. La polarité dans le zygote est alors identique à celle due à la position du F chez le mâle.

b) Chez un mâle uvr^+ , le laps de temps qui s'écoule entre l'irradiation et le transfert est suffisant pour que l'excision des dimères ait lieu, mais pas pour que les brèches aient été réparées, au moins dans leur majorité. Quand un tel trou atteint la fourche de réplication de transfert, il bloque le système, et le transfert de la région chromosomique distale est inhibé. Le matériel qui a pu entrer dans la femelle n'est formé que d'ADN non lésé ou qui a pu être réparé avec le transfert.

Les résultats obtenus par Wilkins et Howard-Flanders (1968) confirment ce modèle : le nombre de crossing-over produits dans le zygote après transfert de l'ADN d'un mâle uvr^+ irradié, est identique au nombre observé dans le témoin, et est indépendant de la forme du gène uvr de la femelle. Il semble donc bien que l'on ait à faire uniquement à de l'ADN non lésé.

Nos expériences nous ont conduits à la même conclusion : après irradiation UV de Hfr H, qui est uvr^+ , nous avons observé une indépendance vis à vis de la dose, du degré de liaison des marqueurs situés dans la région antérieure au marqueur sélectionné.

c) Eventchik, Stacey et Hayes (1969) ont comparé la sensibilité d'inactivation de la transmission d'un marqueur chez un mâle uvr^+ ou uvr^- , et n'ont observé aucune différence fondamentale. Le modèle proposé suppose que les lésions s'opposent au transfert dans le premier cas et à l'intégration dans

le deuxième cas. Ces résultats indiqueraient alors que l'efficacité de blocage est sensiblement la même aux deux niveaux.

d) Des résultats obtenus par Doudney et Bruce (1966) sont compatibles avec ce modèle : la fréquence de transmission des marqueurs d'un mâle uvr^+ irradié augmente avec la durée d'incubation de ce dernier à 37°C avant le croisement. Cette augmentation n'a pas lieu si la synthèse de l'ADN est bloquée pendant l'incubation.

L'incubation donne au mâle le temps de terminer la réparation des régions portant des excisions.

L'expérience complémentaire sur un mâle uvr^-, pour lequel l'incubation devrait être indifférente, n'a pas été effectuée, à notre connaissance.

2) Irradiation de la femelle avant le croisement

Cette irradiation introduit dans le zygote sur le matériel de la femelle des lésions réparables par son système uvr. Son incapacité à les réparer va se traduire par une augmentation du nombre des crossing-over, avec intégration préférentielle du matériel du mâle.

Après irradiation d'une femelle uvr^+, la souche PA 309, nous avons observé aussi une augmentation de l'incorporation du matériel du mâle. La femelle devant normalement réparer les lésions produites, cette augmentation peut être due au fait que la réparation n'est jamais totale, ou plutôt à une compétition entre réparation et intégration.

On devrait probablement observer une différence de sensibilité de la fréquence de crossing-over ou de l'intégration du matériel du mâle, entre ces deux femelles. L'expérience d'irradiation d'une femelle uvr^- n'a pas été effectuée.

3) Ce modèle permet de prévoir qu'après irradiation d'un zygote, qui introduit des lésions réparables en quantités égales dans l'ADN des deux parents, les fréquences relatives d'incorporations des deux génômes ne doivent pas être modifiées, quelle que soit la forme du gène uvr de la F^- . Par contre les quantités absolues de recombinants viables formés vont diminuer très rapidement avec la dose.

Si la F^- ne peut pas exciser les dimères induits, il s'ensuivra une forte augmentation du nombre de crossing-over, initiés aussi bien à partir du matériel mâle qu'à partir de celui de la femelle.

Si la femelle est uvr^+ , la compétition entre les phénomènes de réparation et d'intégration, et la réparation incomplète conduiront vraisemblablement, comme après irradiation de la F^- uvr^+ seule, à une augmentation du nombre des crossing-over, qui ici ne favoriseront aucun des génômes. Il est possible qu'il s'ajoute ici un effet de saturation des systèmes de réparation, qui n'auront pas le temps de prendre en charge la réparation de deux génômes avant que le processus d'intégration ne commence.

Des résultats allant dans ce sens ont effectivement été obtenus par Wilkins et Howard-Flanders (1968).

3) Influence des réparations par le système rec

Ce mécanisme de réparation fonctionne sur des ADN ayant effectué une réplication après l'apparition des lésions, c'est-à-dire des ADN présentant par exemple des régions simple chaîne, au niveau ou non de la lésion.

Ce type de réparation n'aura donc pas lieu dans le mâle, à moins de permettre aux cellules d'effectuer une réplication avant le croisement. Une augmentation de la fréquence de

transmission d'un F'Lac a effectivement été observée par Howard Flanders et coll. (1968) après incubation de plusieurs heures d'un mâle F'Lac^{+} uvr B rec^{+} préalablement irradié aux UV. Un mâle uvr B rec A, dans les mêmes conditions, ne modifie pas sa fréquence de transmission.

Ces mêmes auteurs ont mis en évidence une réparation par recombinaison dans le sygote, après transfert de l'épisome d'un mâle F'Lac uvr^{+} irradié aux UV. L'incubation préalable du mâle, si il est aussi rec A, produit une diminution de la transmission de F'Lac. Il est possible que l'ADN irradié subisse dans le mâle des modifications, telles que dégradations ou recombinaison abortive, qui après réplication, peuvent soit bloquer le transfert, soit n'être plus réparables par la femelle.

ooo ooo

ooo

C H A P I T R E H

RESUME ET CONCLUSIONS

L'étude de l'effet des radiations sur le système de conjugaison de E. Coli K12 qui a été effectuée dans ce travail a permis de mettre en évidence un phénomène inattendu de modification de la séquence normale d'injection de certains Hfr.

Il semble intéressant de rapprocher ce phénomène de certaines observations qui ont été faites concernant des cas de conjugaison "anormaux", c'est-à-dire ne paraissant pas être dûs à une injection du chromosome du mâle entièrement contrôlée par le facteur sexuel.

Les premières études relatives à l'effet des radiations sur la conjugaison ont montré qu'une irradiation du mâle Hfr H préalable au croisement perturbe uniquement le transfert. D'après les résultats de Fuerst et coll. (1956), il semblait que les lésions produites par le 32P incorporé dans l'ADN inactivait le transfert de façon proportionnelle à la dose et à la longueur de chromosome étudiée. C'est-à-dire que des lésions capables d'arrêter le transfert sont produites au hasard sur toute la longueur du chromosome. Il semblait, par contre, que l'inactivation du transfert par la lumière ultraviolette était un effet global, indépendant de la distance des marqueurs considérés à l'origine de transfert (Jacob et Wollman 1955).

Marcovich (1961) puis Wood et Marcovich (1964) ont repris cette étude de façon plus précise, en utilisant des radiations ionisantes (rayons X et particules α émises par du ^{212}Po) Krisch (1965) a complété l'étude de l'effet du 32P incorporé et désintégré dans l'ADN du mâle préalablement au croisement.

Les résultats obtenus dans tous les cas confirment les premières conclusions de Fuerst et coll. (1956).

L'efficacité des radiations à bloquer le transfert de la région distale du chromosome est environ trois fois plus élevée que leur capacité de tuer la cellule. Il a été proposé que les mêmes lésions seraient responsables de ces deux effets, avec pour chacune une probabilité de 1/3 de tuer la cellule.

Ces auteurs ont observé qu'aucun des types de radiations utilisés sur le mâle ne produit d'inactivation de l'efficacité à conjuguer ni de perturbation de l'intégration dans le génôme de la femelle, des régions du génôme mâle transférées.

La différence de réponse mise en évidence par Jacob et Wollman (1955) après irradiation UV du mâle pouvait être un phénomène intéressant, à cause du mode d'action spécifique de ce rayonnement. Nous avons donc repris cette étude de façon détaillée sur la souche Hfr H (Joset et Wood 1966), et abouti aux conclusions suivantes :

1) L'effet des UV sur le transfert lui-même est entièrement comparable à celui des radiations ionisantes. Le rapport des efficacités létale et d'inactivation du transfert est aussi d'environ 1/3.

2) Un effet spécifique des UV apparaît : la capacité des mâles à conjuguer est inactivée suivant une loi exponentielle en fonction de la dose, avec une efficacité un peu plus faible que la mort des cellules.

Les résultats décrits ici relatifs à l'action des UV sur les différentes étapes de la conjugaison, en particulier le transfert et l'intégration, ainsi que ceux qui ont été obtenus par d'autres auteurs, ont permis de proposer un mécanisme d'action de ce rayonnement :

- Toute lésion produite dans un mâle incapable de réparer par excision (uvr$^-$) est transférée à la femelle, sous une forme non réparable par excision, et entraine une augmentation du nombre des recombinaisons, au profit du matériel de la femelle.

- Si le mâle est capable d'exciser les régions lésées, les lésions provoqueront une inhibition de transfert tant que les régions touchées n'auront pas été totalement réparées.

- Dans l'un et l'autre cas, aucune lésion réparable par excision n'est transférée à la femelle. La capacité de celle-ci à réparer par excision est indifférente.

L'étude de l'effet des radiations a été étendue à un nombre assez élevé de mâles Hfr. Il s'est avéré que chez environ la moitié d'entre eux seulement (5 sur 13) les radiations inactivent le processus de conjugaison suivant le schéma décrit pour Hfr H. Chez les autres Hfr, les résultats suivants ont été obtenus :

1) Les radiations, quel qu'en soit le type, induisent ces mâles à transférer leur génôme suivant une nouvelle orientation caractéristique de chacun. Une partie des souches est induite à transférer suivant une orientation inverse de l'orientation normale. Tous les mâles issus du F$^+$ W 1485, par contre, montrent la même séquence de transfert après irradiation, la nouvelle origine étant nettement distincte de l'origine normale de chacun des mâles du groupe.

2) La fréquence de production de cette modification est élevée : pour une dose donnant une survie des mâles de 10^{-3} environ, entre 10 et 50 % de la population totale sont affectés. L'efficacité relative des radiations, par rapport à leur effet létal, est d'environ 1 lésion modifiant la séquence de transfert pour 7 à 8 lésions létales.

3) Une caractéristique importante du phénomène est son instabilité. La capacité de transfert suivant la séquence induite disparaît dès la première division des cellules consécutive à l'irradiation. On ne sait pas, actuellement, si la cellule induite conserve l'inversion de transfert ou non. Dans le cas de l'un des mâles seulement, Ra-1, il a été possible d'isoler avec une fréquence très inférieure à la fréquence d'induction, quelques clones "inversés" stables. Cette inversion de transfert n'est pas non plus transmise aux recombinants, même à ceux qui sont issus d'un événement de transfert inverse, immédiatement après irradiation.

4) Un certain nombre d'arguments permettent de conclure qu'il s'agit d'une transformation individuelle de chaque cellule Hfr normale, et non d'une sélection de mâles "inversés" préexistants ou d'une induction spécifique des cellules F^+ présentes au moment de l'irradiation. A cette modification s'ajoute l'inactivation de l'un et de l'autre type de transfert, suivant un processus identique à celui qui a été décrit pour Hfr H.

Les hypothèses que l'on peut avancer pour expliquer ce phénomène sont de deux types :

a) Il pourrait s'agir d'une transposition du facteur sexuel. Il faudrait alors expliquer sa spécificité et sa haute fréquence.

b) Il pourrait s'agir de l'induction d'un transfert "anormal", sans participation directe, ou sans contrôle total, du facteur sexuel. Par exemple, utilisation comme matériel à transférer, d'un chromosome dont la séquence de synthèse résulterait de l'effet de l'irradiation (synthèse de réparation).

Les résultats obtenus, encore incomplets, indiquent :

1) qu'il n'y a probablement pas deplacement du facteur sexuel, ni à un autre endroit du chromosome, ni sous forme d'episome libre.

2) Il est probable que la séquence de transfert induite ne correspond pas à la séquence de réplication végétative du chromosome. Il n'est cependant pas exclu que cette modification corresponde effectivement à un mode de conjugaison non "classique", dans lequel le facteur sexuel serait responsable des étapes préliminaires du transfert, et serait éventuellement responsable d'une réplication spécifique du transfert, mais dont la séquence serait déterminée par un événement extérieur, tel que l'ouverture d'une chaîne d'ADN consécutive à une radiolésion.

Nous envisageons de poursuivre l'étude de ces mâles dans les directions suivantes :

- Etude génétique. On peut envisager de chercher des mutants du facteur sexuel ou du chromosome bactérien dont la séquence de transfert resterait stable après irradiation. De tels mutants permettraient de connaître les mécanismes impliqués dans l'inversion de transfert.

- Etude métabolique. Il semble que les conditions métaboliques de la cellule après l'irradiation jouent un rôle important dans le maintien ou l'expression de l'inversion de transfert. Il existe peut-être de ce côté une voie d'accès à la connaissance du processus.

ooo ooo

ooo

B I B L I O G R A P H I E

ABE M.,TOMIZAWA J. (1967) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1911, LB.

AMES B.N., HARTMAN P.E., JACOB F. (1963) - J. Mol. Biol., 23

BARNER H.D., COHEN S.S. (1956) - J. Bacteriol., 72, 115-123.

BASTARRACHEA F., WILLETTS N. (1968) - Genetics, 59, 153-66.

BEUKER R., BERENDS W. (1960) - Biochim. Biophys. Acta, 41, 550-1.

BILLEN D., HEWITT R., LAPTHISOPHON T., ACHEY P.M. (1967) - J. Bacteriol., 94, 1538-45.

BILLEN D., HEWITT R., JORGENSEN G. (1965) - Biochim. Biophys. Acta, 13, 440-54.

BONHOEFFER F., HOSSELBARTH R., LEHMAN V. (1967) - J. Mol. Biol., 29, 539-41.

BONHOEFFER F., SCHALLER W. (1965) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 20, 93.

BRESLER E., LANZOV V.A., BLINKOVA A.A. (1967) - Genetics, 56, 105-16.

BRINTON C. , GEMSKI P., CARNAHAN J. (1964) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 52, 776-83.

BRODA P. (1967) - Genet. Res., 9, 35-47.

BRODA P., BECKWITH J., SCAIFE J. (1964) - Genet. Res., 5, 489-94

CAMPBELL A. (1962) - Advan. Genet., 11, 101-145.

CARO L. (1971) - J. Mol. Biol., 55, 441-56.

CARO L., BERG C. (1968) - Cold Spring Harbor Symp QUant Biol., 33, 559-74.

CERDA-OLMEDO E., HANAWALT P.C., GUEROLA N. (1968) - J. Mol. Biol., 33, 705.

CLARK A.J. (1963) - Genetics, 48, 105-20.

CLARK A.J., MARGULIES A.D. (1965) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 451.

CLARK A.J., WILLETTS N., IPPEN K. (1970) - Comm. Lunteren Lectures on Mol. Genetics.

CLOWES R., MOODY E. (1966) - Genetics, 53, 717-26.

COHEN A., FISHER W.D., CURTISS R., ADLER H. (1968) - Cold Sprin Harbor Symp Quant Biol., 33, 635-42.

CURTISS R. (1962) - Ph. D. Thesis University of Chicago.

CURTISS R. (1964) - Bacteriol. Proc., 30.

CURTISS R. (1968) - Genetics, 58, 9-54.

CURTISS R., CHAMARELLA J. (1966) - Genetics, 54, 329-30.

CURTISS R., CHAMARELLA J., STALLIONS, MAYS J. (1968) - J. Bacteriol., 32, 320-48.

CURTISS R., RENSHAW J. (1969a) - Genetics, 63, 7-26.

CURTISS R., STALLIONS D.R. (1969) - Genetics, 63, 27-38.

CUTLER B., EVANS D.E. (1967) - J. Mol. Biol., 26, 91.

CUZIN F. (1966) - Thèse de Doctorat, Université de Paris.

CUZIN F., BUTTIN G., JACOB F. (1967) - J. Cell. Comp. Physiol., 70, Supp. 1, 77-88.

CUZIN F., JACOB F. (1964) - C. R. Acad. Sci. Paris, 258, 1350.

CUZIN F., JACOB F. (1965) - C. R. Acad. Sci. Paris, 260,2087-90

CUZIN F., JACOB F. (1967) - Ann. Inst. Pasteur, 112, 397-418.

DE HAAN P.G., GROSS J.D. (1962) - Genet. Res., 3, 251-72.

DEWITT S., ADELBERG E.A. (1962) - Genetics, 47, 577-86.

DONACHIE W.D., MASTERS M. (1966) - Genet. Res., 8, 119.

DOUDNEY C.O., BRUCE B.J. (1966) - Rad. Res., 28, 597-608.

ESPARDELLIER-JOSET F., FOURNIER R. (1966) - Genet. Res., 7 , 353-61.

ESPARDELLIER-JOSET F., HARRIMAN P.D., GOTS J., MARCOVICH H. (1967) - C. R. Acad. Sci. Paris, 264, 1541.

EVENTCHIK Z., STACEY K.A., HAYES W. (1969) - J. Gen. Microbiol. 56, 1-14.

FANGMAN W.L., NOVICK A. (1968) - Genetics, 60, 117.

FRANKLIN N. (1967) - Genetics, 55, 699-707.

FREIFELDER D. (1968) - J. Mol. Biol., 35, 95-102.

FUERST C., JACOB F., WOLLMAN E.L. (1956) - C. R. Acad. Sci. Paris, 243, 2162-4.

GILBERT W., DRESSLER D. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 473-84.

GINGERY R., ECHOLS H. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 721-8.

GROSS J.D. - KARAMATA D., HEMPSTEAD P.G. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 307-21.

HAYES W. (1952) - Nature, 169, 1017.

HAYES W. (1953) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 18, 75.

HAYES W. (1960) - Symp Soc Gen Microbiol., 10, 12-38.

HELMSTETTER C.E. (1968) - J. Bacteriol., 95, 1634.

HERSHEY A.D., KAMEN M.D., KENNEDY J.W., GEST H. (1951) - J. Gen Physiol., 34, 305.

HEWITT R., BILLEN D. (1964) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 88-92.

HIROTA Y., SNEATH P.H. (1961) - Jap. J. Genet., 36, 307-18.

HOWARD-FLANDERS P. (1968) - Annual Rev. Biochem., 37, 175-200.

HOWARD-FLANDERS P., BOYCE R. (1966) - Radi Res. Supp., 6, 156-6

HOWARD-FLANDERS P., RUPP W.D., WILKINS B., COLE R. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 195.

IKEDA H., TOMIZAWA J. (1965) - J. Mol. Biol., 14, 85.

INSELGURG J. (1967) - J. Bacteriol., 94, 1266-7.

JACOB F., BRENNER S., CUZIN F. (1953) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 28, 329-48.

JACOB F., MONOD J. (1961) - J. Mol. Biol., 3, 318-56.

JACOB F., ULLMAN A., MONOD J. (1964) - C. R. Acad. Sci. Paris, 258, 3125.

JACOB F., ULLMAN A., MONOD J. (1965) - J. Mol. Biol., 13, 704.

JACOB F., WOLLMAN E.L. (1955) - C. R. Acad. Sci. Paris, 240, 2566-68.

JACOB F., WOLLMAN E.L. (1958) - Ann. Inst. Pasteur, 95, 497-519

JACOB F., WOLLMAN E.L. (1961) - Sexuality and the Genetics of Bacteria.Academic Press, N.Y.

JAGGER J., LATARJET R. (1956) - Ann. Inst. Pasteur, 91, 858.

JOSET F., LOW B., KRISCH R. (1964) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 742-47.

JOSET F., WOOD TH (1966) - Genetics, 53, 343-56.

KELNER A. (1953) - J. Bacteriol., 65, 252-62.

KOGOMA T., LARK K.G. (1970) - J. Mol. Biol., 52, 143-64.

KOHIYAMA M., LANFORM H., BRENNER S., JACOB F. (1963) - C. R. Acad. Sci. Paris, 257, 465-86.

KORN D., WEISSBACH (1962) - Biochim. Biophys. Acta, 61, 773-9

KRISCH R. (1965) - Genet. Res., 6, 454-68.

LARK K.G. (1966) - Bacteriol. Rev., 30, 3-32.

LARK K.G., RENGER H. (1969) - J. Mol. Biol., 42, 221.

LARK K.G., REPKO T., HOFFMAN E. (1963) - Biochim. Biophys. Acta 76, 9-24.

LEDERBERG J. (1958) - Abst. Commun, 7th Intern. Cong. Microbiol Stockholm 59-60.

LEVINTHAL M., NIKAIDO H. (1969) - J. Mol. Biol., 42, 511-20.

LOW B. (1965) - J. Bacteriol, 93, 98

LOW B. (1967) - J. Bacteriol., 93, 98

MAALE O., HANAWALT P.C. (1961) - J. Mol. Biol., 3, 144-55.

MAAS R. (1963) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 50, 1051-54.

MARCOVICH H. (1961) - Ann. Inst. Pasteur, 101, 660-76.

MATNEY T.S., GOLDSCHMIDT E.P., ERWIN N.S. (1963) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 483-86.

MATSUSHIRO A., KIDA S., SATO K., IMAMOTO F. (1962) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 9, 204.

OGAWA H., TOMIZAWA J. (1967) - J. Mol. Biol., 30, 1-6.

OHKI J., TOMIZANA J. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 651.

OPPENHEIM A., RILEY M. (1967) - J. Mol. Biol., 28, 503-11.

ORSKOV I., ORSKOV F. (1960) - Acta Patol. Microbiol. Scand., 48, 37-66.

PETTIJOHN D.E., HANAWALT P.C. (1964) - J. Mol. Biol., 9, 395-410.

PITTARD J. (1965) - J. Bacteriol., 89, 680-6.

PITTARD J., ADELBERG E. (1964) - Genetics, 49, 995-1007.

PITTARD J., RAMAKRISHAN R. (1964) - J. Bacteriol., 88, 367-73

PRITCHARD R.H., BARTH P.T., COLLINS J. (1969) - Symp. Soc. Gen. Microbiol., 19, 263.

PRITCHARD R.H., LARK K.G. (1964) - J. Mol. Biol., 9, 288-307.

REEVES P. (1960) - Nature, 185, 265-6.

REVEL H.R. (1965) - J. Mol. Biol., 11, 23-34.

RICHTER A. (1961) - Genet. Res., 2, 333-45.

ROSENBERG B., CAVALIERI L., UNGERS G. (1969) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 63, 1410-17.

RUPERT C.S. (1960) - J. Gen. Physiol., 43, 573-95.

RUPP W.D., HOWARD-FLANDERS P. (1968) - J. Mol. Biol., 31, 291-304.

RUPP W.D., IHLER G. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 647-50.

SAUERBIER W., HAUG A. (1964) - J. Mol. Biol., 10, 180-3.

SCAIFE J. (1966) - Genet. Res., 8, 189-90.

SCAIFE J., GROSS J. (1962) - Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 403.

SCAIFE J., GROSS J.D. (1963) - Genet. Res., 4, 328.

SCAIFE J., PEKHOV A.P. (1964) - Genet. Res., 5, 495.

SCHWARTZ M. (1966) - J. Bacteriol., 92, 1083-89.

SETLOW R., SETLOW J. (1962) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 1250.

SETLOW R., CARRIER W.L. (1964) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 51, 226-31.

SETLOW R. (1967) - In Régulation of Nucleic Acids and Protein Biosynthesis, Konigsberger VV, Bosh L Eds, Elsevier, Amsterdam, p. 51-62.

SICARD N., DEVORET R. (1962) - C. R. Acad. Sci. Paris, 225, 1417-19.

SIDDIQUI O.H. (1963) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 59, 589-92.

SIGNER E., BECKWITH J. (1966a) - J. Mol. Biol., 19, 254-65.

(1966b) - J. Mol. Biol., 19, 576.

(1966c) - J. Mol. Biol., 22, 33.

SIGNER E.R., WEIL J. (1968) - Cold Spring Harbor Symp Quant Biol., 33, 715-20.

SNEATH P., LEDERBERG J. (1961) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 47, 86-90.

TAYLOR A.L. (1970) - Bacteriol. Rev., 34, 155-75.

TAYLOR A.L., TROTTER C.D. (1967) - Bacteriol. Rev., 31, 332.

TOMIZAWA J., OGAWA H. (1967) - J. Mol. Biol., 30, 7-15.

VAN DE PUTTE P., VAN SLUIS C.A., VAN DILLEWIJN E., RORSCH A. (1965) - Mutat. Res., 2, 97-110.

VAPNEK D., RUPP W.D. (1970) - J. Mol. Biol., 53, 287-303.

VIELMETTER W., BONHOEFFER F., SHCUTTE A. (1968) - J. Mol. Biol. 37, 81-6.

WARD C.B., GLASER D.A. (1969) - Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 64, 905-12.

WILKINS B., HOWARD-FLANDERS P. (1968) - Genetics, 60, 243-55.

WILLETTS N., BRODA P. (1969) - In Bacterial Episomes and Plasmids. Ciba Foundation Symp. Wolstenholme and O'Connor E.D., 32-51.

WOLF B., NEWMAN A., GLASER D. (1968) - J. Mol. Biol., 32, 611-29.

WOOD T.H., MARCOVICH H. (1964) - Genetics, 49, 779-86.

ooo ooo

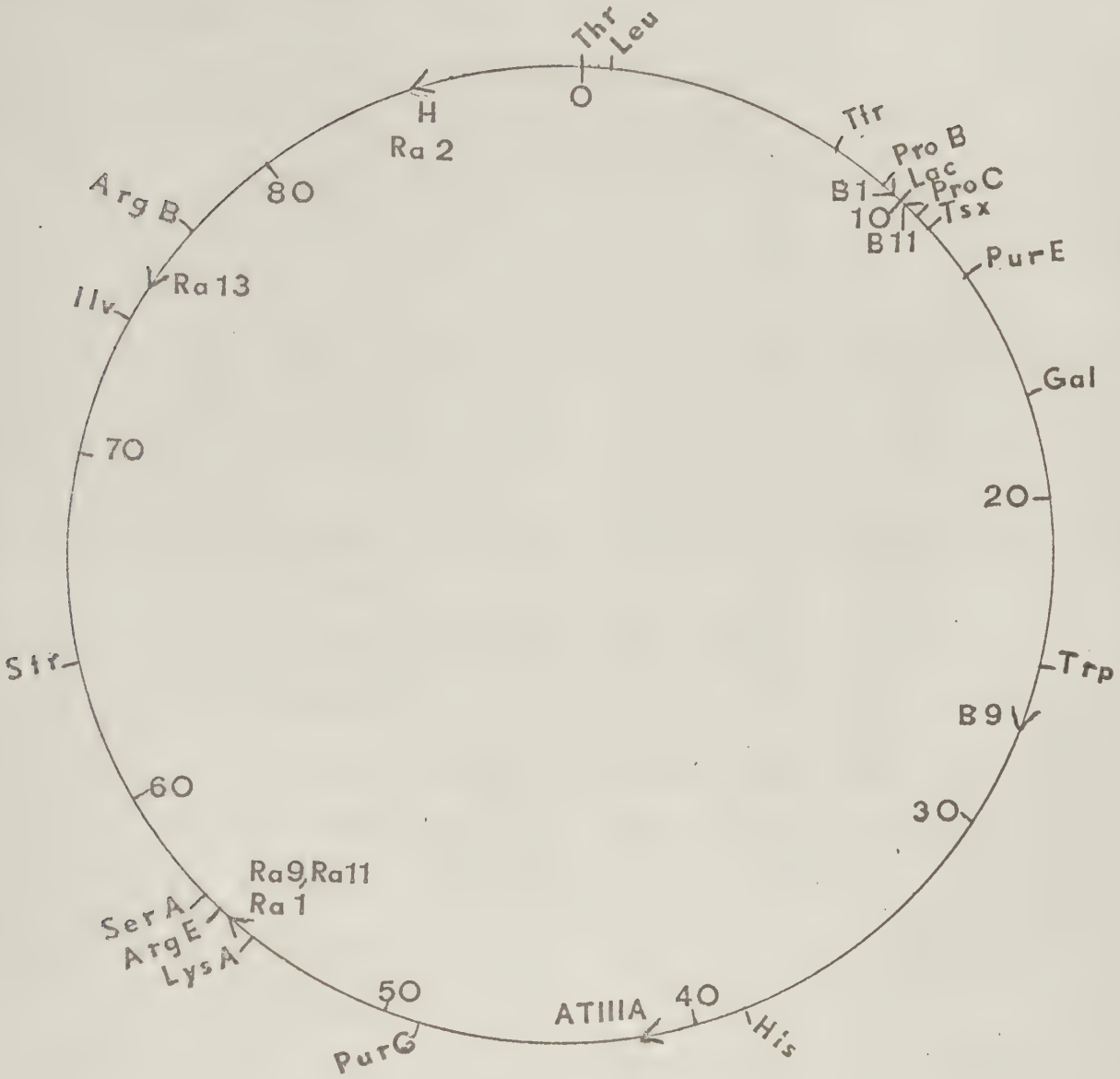
ooo

APPENDICE

SOUCHES DE BACTERIES ET DE PHAGES UTILISEES

NONS	PROVENANCE	CARACTERES	
nelles			
309	Inst Pasteur	$Thr^-Leu^-Trp^-Gal^-His^-Srt^rArg_B^-$	
360	"	Thr^- Leu^- Ser-Gly^- Str^r Arg_B^-	
3344	"	Thr^- Leu^- Pro_B^- Trp^- Pur_G^- Str^r Ilv^- Arg_B^-	
330	"	Thr^- Leu^- His^- Pur_G^- Str^r Arg_B^-	
333-1	Mutant UV de PA 330	id. + Pro_B^-	
309-1	Mutant UV de PA 309	id. PA 309 + Ilv^-	
2345	Inst Pasteur	Leu^- Pro_C^- Trp^- Pur_E^- Str^r	
2985	"	Arg_E^-	
Mâles F+			
1485	Dr. Huppert (Villejuif)	Str^s	
1655	Dr. Broda (Edimbourg)	Str^s $Mét^-$	
les Hfr			Ordre d'injection
	Inst Pasteur	Str^s	Thr, Leu,.....Str, Arg_B
-1	Mutant UV de W 1485	Str^s	Lys_A, His, ...Arg_B, Str
-2	"	Str^s	Thr, Leu, ... Str, Arg_B
-9	"	Str^s	Pur_G, His, ...Arg_B, Str
-11	"	Str^s	Pur_G, His, ...Arg_B, Str
-13	"	Str^s	Ilv, Arg_B, ...His Str
IIA	Inst Pasteur	Str^s	His Trp, ...Arg_B, Str
1	Mutant spont de W 1655	Str^s $Mét^-$	Pro_C, Tsx, Pur_E,.... Leu, Pro_B, Lac
	"	Str^s Met^-	Pro_B, Leu Thr, ... His, Trp
	"	Str^s $Mét^-$	Shik, Trp, Lac,....Str; His
1Thy	Mutant spont de B-11	Str^s $Mét^-Thy^-$	Pro_C, Tsx, Pur_E,....Leu, Pro_B, Lac
ages			
KC	Tomizawa	mutant virulent de P1, transducteur généralisé	
	Dr Devoret	phage spécifique des mâles de Coli k 12	

CARTE DU CHROMOSOME DE E. COLI



Les symboles utilisés sont ceux qui sont définis par Taylor (Bacteriol Rev 34,(1970), 155-200).

CONDITIONS DE CROISEMENTS.

Mâle	Femelle	Durée min.	Recombinants sélectionnés	Figu ou Table
H	PA 309	90	Thr^+Str^r, Leu^+Str^r, Trp^+Str^r, His^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$, Gal^+Str^r	Fig C1 C2, C3 C4, C5 C6, C7
a-1	PA 309	120	His^+Str^r, Trp^+Str^R, Thr^+Str^r, Leu^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$	Fig D1
		90	id	Fig D2 D3
-11	PA 3344	90	$Pur_G^+Str^r$, $Arg_B^+Str^r$, Thr^+Str^r, $Pro_B^+Str^r$, Trp^+Str^r Ilv^+Str^r	Fig D4
-2	PA 309	90	Thr^+Str^r, Leu^+Str^r, Trp^+Str^r, His^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$	Tab D1 Fig D5
-9	PA330-1	90	Leu^+Str^r, $Pro_B^+Str^r$, His^+Str^r, $Pur_G^+Str^r$, $Arg_B^+Str^r$	"
-13	PA309-1	90	Leu^+Str^r, Trp^+Str^r, His^+Str^r, Ilv^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$	"
IIIA	PA 309	90	His^+Str^r, Trp^+Str^r, Leu^+Str^r, Thr^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$	"
11	PA 309	90	Trp^+Str^r, His^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$, Leu^+Str^r Thr^+Str^r	Fig E1 E3
11	PA 3344	90	Trp^+Str^r, $Pur_G^+Str^r$, $Arg_B^+Str^r$, Leu^+Str^r, $Pro_B^+Str^r$	Fig E1
1	PA309	90	Leu^+Str^r, $Arg_B^+Str^r$, His^+Str^r, Trp^+Str^r	Fig E4
9	PA 309	90	Trp^+Str^r, Leu^+Str^r, His^+Str^r	Fig E4
11	AB 2345	120	Leu^+Str^r, $Pur_E^+Str^r$	Fig E7 Tab E4
cB11	PA 360	90	His^+Trp^+, Arg^+Trp^+, His^+Leu^+, Arg^+Leu^+	Tab E5
B2345				

MILIEUX DE CULTURE

		liquide	gélosé (mou)	gélosé(dur)
omplet BT	Na Cl	5g	5g	5g
	Bacto Tryptone	5g	5g	5g
	Nutrient Broth	3g	-	-
	Peptone	-	8g	8g
	H_2O	10^3cc	10^3cc	10^3cc
	Bacto Agar	-	7,5g	15g
nthètique E	Sol. mère	20 ml	20 ml	20 ml
	H_2O	10^3cc	10^3 cc	10^3cc
	Bacto Agar	-	7,5g	15g

lution mère pour Milieu E

H_2O	670 cc	PO_4K_2H, anhydre	500g
SO_4Mg, $7H_2O$	10g	PO_4NaNH_4H, $4H_2O$	175g
Acide Citrique	100g		

Broth	Bacto Peptone	10g	10g	10g
ennox)	Yeast Extract	5g	5g	5g
	Na Cl	5g	5g	5g
	H_2O	10^3cc	10^3cc	10^3cc
	Bacto Agar	-	6,5g	15g
	$Ca\ Cl_2$	$2,5.10^{-3}$ M	$2,5.10^{-3}$ M	$2,5.10^{-3}$

		liquide	gélosé	
IEU COMPLET	Na Cl	10g	10g	10g
A 10	Bacto-Tryptone	10g	10g	10g
	Yeast Extract	5g	5g	5g
	H_2O	10^3cc	10^3cc	10^3cc
	Ajuster à pH 7			
	Bacto Agar	-	5g	10g
	Après stérilisation ajouter			
	Glucose à 20%	5cc	5cc	5cc
	$CaCl_2$, $2H_2O$, 0,5M	5cc	5cc	5cc

CONCENTRATIONS FINALES DES DIVERS PRODUITS UTILISES

Thréonine	30 γ/ml
Leucine	"
Arginine	"
Méthionine	"
Proline	"
Sergne	"
Glycine	"
Lysine	"
Tryptophane	10 γ/ml
Histidine	20 γ/ml
Adenine	10 γ/ml
Guanine	"
Thymine	2 γ/ml
Thiamine	3 γ/ml
Streptomicine	60 γ/ml
Galactose	0,4 %
Glucose	"
Lactose	"

TABLE des MATIERES

	Pages
CHAPITRE A - INTRODUCTION	1
CHAPITRE B - LES FONCTIONS DU FACTEUR SEXUEL	7
I - Fonctions de réplication.	7
II - Fonctions de transfert.	8
III - Incompatibilité et immunité	10
IV - Nature et mécanisme de l'attachement au chromosome	11
V - Existence d'autres processus de transfert chromosomique.	12
CHAPITRE C - MECANISME DE LA TRANSMISSION DU MATERIEL GENETIQUE AU COURS DE LA CONJUGAISON CHEZ LE MALE Hfr H - UTILISATION DES RADIATIONS	15
I - Caractéristiques du transfert.	16
II - Utilisation des radiations.	17
III - Effet de la lumière ultraviolette.	21
IV - Mécanisme de l'intégration.	24
V - Conclusion.	
CHAPITRE D - INDUCTION A HAUTE FREQUENCE D'UNE MODIFICATION DE LA SEQUENCE DE TRANSFERT DU MALE E. COLI Hfr Ra-1	30
I - Mise en évidence d'une anomalie de transfert.	30
II - Comportement des quelques souches isogènes de Ra-1.	34
III - Estimation de l'efficacité d'induction.	36
IV - Les modèles possibles et leurs implications.	40

Pages

CHAPITRE E - INDUCTION A HAUTE FREQUENCE D'UNE ANOMALIE DE TRANSFERT CHEZ LE MALE Hfr B-11. 49

I - Caractérisation de l'anomalie de transfert induite chez B-11. 49

II - Etude de quelques souches isogènes de B-11 51

III - Estimation de l'efficacité d'induction. 52

IV - Recherche d'une modification chromosomique chez B-11 irradié. 53

V - Conclusion 61

CHAPITRE F - IMPLICATIONS DE L'INVERSION DE TRANSFERT AU NIVEAU DE LA REPLICATION 64

I - Caractéristiques de la réplication végétative chez B-11. 66

II - Détermination de la séquence de réplication du chromosome de B-11. 68

III - Contrôle de l'inversion de transfert au niveau des synthèses macromoléculaires - Résultats et discussion. 76

CHAPITRE G - ESSAI D'INTERPRETATION DE L'EFFET DES ULTRAVIOLETS SUR LA CONJUGAISON AU NIVEAU MOLECULAIRE. 81

I - Modification des processus de synthèse de l'ADN par introduction de lésions UV. 81

II - Réparation des lésions. 82

III - Modèle possible d'effet des UV sur la conjugaison. 84

CHAPITRE H - RESUME ET CONCLUSIONS 90

BIBLIOGRAPHIE 95

APPENDICE